



Departamento de Biología Molecular

EL RECEPTOR BOMBESINA SUBTIPO 3 (BRS-3): *Diana terapéutica en la Obesidad y en la Diabetes*

Irene Ramos Álvarez

Madrid, 2013

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

EL RECEPTOR BOMBESINA SUBTIPO 3 (BRS-3): *Diana terapéutica en la Obesidad y en la Diabetes*

Trabajo presentado por **Irene Ramos Álvarez**,
Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al
grado de Doctor.

Director: Dra. Nieves González Gómez

Tutor académico: Prof. José María Carrascosa Baeza

Lugar de realización: IIS-Fundación Jiménez Díaz

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	4
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN.....	6
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. SUJETOS y MUESTRAS de ESTUDIO.....	22
2. MIOTÚBULOS HUMANOS	23
2.1. Aislamiento de mioblastos	23
2.2. Cultivo y diferenciación.....	24
3. COMPUESTOS e INHIBIDORES	25
4. ARNm.....	26
4.1. Aislamiento de ARN del músculo esquelético	26
4.2. Aislamiento de ARN de miotúbulos.....	26
4.3. Síntesis de ADNc.....	28
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	28
5. SILENCIAMIENTO del GEN que CODIFICA el RECEPTOR BRS-3.....	29
6. PROTEÍNA	30
6.1. Extracción de proteína del músculo esquelético	30
6.2. Extracción de proteína de membrana plasmática de miotúbulos.....	31
6.3. Extracción de proteína del citoplasma de miotúbulos	31
6.4. Western blot	32
i) Separación de proteínas.....	33
ii) Transferencia	34
iii) Inmunodetección	34
7. ACTIVIDAD PI3K.....	37
8. TRANSPORTE de GLUCOSA	37
9. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA <i>a</i>	38
10. SÍNTESIS de GLUCÓGENO	39
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	41

RESULTADOS	42
1. NIVELES de ARNm y PROTEÍNA BRS-3, en MÚSCULO ESQUELÉTICO de SUJETOS NORMALES, PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2.....	42
2. EFECTO del BRS-3-AP sobre los NIVELES de ARNm y PROTEÍNA BRS-3, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2.....	42
3. EFECTO del BRS-3-AP sobre la ACTIVIDAD de las ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2	47
3.1. PI3K/PKB	47
3.2. p70s6K	48
3.3. MAPKs	52
3.4. p90 RSK-1	53
4. EFECTO del BRS-3-AP sobre los NIVELES de ARNm y PROTEÍNA GLUT-4, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2.....	56
5. EFECTO del BRS-3-AP sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2	60
6. VÍAS de SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR en la ACCIÓN del BRS-3-AP sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES.....	62
7. SELECTIVIDAD del BRS-3-AP en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES	64
7.1. Nivel de ARNm BRS-3, en células silenciadas de sujetos normales.....	65
7.2. Efecto del BRS-3-AP en células silenciadas, sobre el transporte de glucosa	65
7.3. Efecto del ME en células no silenciadas, sobre el transporte de glucosa	65
8. EFECTO del BRS-3-AP sobre la ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA <i>a</i> y SÍNTESIS DE GLUCÓGENO, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2	65
8.1. Actividad glucógeno sintasa <i>a</i>	67
8.2. Síntesis de glucógeno	67
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	84
ARTÍCULO PUBLICADO RELACIONADO CON LA TESIS	95

ABREVIATURAS

AC	adelinato ciclase
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
Akt	proteína quinasa B
Ala	alanina
ANOVA	análisis de la varianza
Arg	arginina
Asp	ácido aspártico
AP-2 α	complejo adaptador relacionado con proteína 2 alpha
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
Asn	asparagina
BRS-3	Receptor Bombesina Subtipo 3
BRS-3*	BRS-3 con una Gln en posición 127 del 3º dominio extracelular
BRS-3-AP	[D-Phe ⁶ , β -Ala ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]bombesin ₆₋₁₄
BSA	albúmina sérica bovina
°C	grado Celsius
CCK _A R	receptor colecistoquinina tipo 2
Ci	curio
cm ²	centímetro cuadrado
CREB	<i>cAMP Response Element Binding protein</i>
Cys	cisteína
dl	decilitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO	densidad óptica
DT2	diabético tipo 2
EC ₅₀	concentración requerida para producir el 50% de la respuesta biológica máxima
EDTA	ácido etilén-diaminotetraacético
EEM	error estándar de la media
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
Elk-1	<i>Ets like gene 1</i>
ERK	proteínas quinasas mitogénicamente activas
Ex-4	exendia 4
Ex-9	exendia 9
FBS	suero fetal bovino
<i>g</i>	fuerza veces mayor que la de la gravedad
GEF	activador de los factores de intercambio Rho
Gli	glicina
Gln	glutamina
GLP-1	péptido similar al glucagón 1
Glu	ácido glutámico
Glut	glucotransportador
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GRP	péptido liberador de gastrina
GRPR	receptor del péptido liberador de gastrina
GSIS	secreción de insulina regulada por glucosa
GSK-3	glucógeno sintasa quinasa-3
H	hombre
h	hora
HbA _{1c}	hemoglobina glicosilada
hEGF	factor de crecimiento epidérmico humano
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]-etanosulfónico
His	histidina

IC ₅₀	concentración requerida para inhibir el 50% de la respuesta biológica máxima
Ig	inmunoglobulina
Ile	isoleucina
IMC	índice de masa corporal
IP ₃	inositolfosfatos
IRS	sustrato del receptor de insulina
Kb	kilo base
KDa	kilo dalton
Kg	kilogramo
Ki	coeficiente de inhibición
Leu	leucina
Lys	lisina
M	molaridad
M	mujer
m ²	metro cuadrado
M-199	Medium 199
MAPKs	proteínas quinasas mitogénicamente activas
ME	[D-Phe ⁶] bombesin ₆₋₁₃ metil ester
MEK-1	proteínas quinasas mitogénicamente activas
Met	metionina
mg	miligramo
min	minuto
MK-5046	(2S)-1, 1, 1-trifluoro-2-[4-(1H-pirazol-1-yl)fenil]-3-(4-([1-(trifluorometil)ciclopropil]metil)-1H-imidazol-2-yl)propan-2-ol
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmol	milimol
mTOR	diana de la rapamicina en células de mamífero
M&M	material y métodos
N	normal
n	número de observaciones
ng	nanogramo
Nle	norleucina
nm	nanometro
NMB	neuromedina B
NMBR	receptor del péptido neuromedina B
OB	obeso
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	probabilidad
p-	fracción fosforilada
p70s6k	proteína quinasa ribosomal de 70 kDa
p90 RSK-1	proteína quinasa ribosomal s kinasa de 90 kDa
PD98059	2-amino-3-metoxiflavona
péptido 1	[D-Tyr ⁶ , β-Ala ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴] bombesin ₆₋₁₄
péptido 2	[D-Tyr ⁶ , (R)-Apa ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴] bombesin ₆₋₁₄
péptido 3	D-Tyr ⁶ , (R)-Apa ¹¹ , 4Cl-Phe ¹³ , Nle ¹⁴] bombesin ₆₋₁₄
péptido 4	Ac-Phe-Trp- Ala-His(tBzl)-Nip-Gly-Arg-NH ₂
pH	potencial de hidrógeno
Phe	fenilalanina
PI3K	fosfatidilinositol 3-kinasa
PIP ₃	fosfatidilinositol 3-fosfato
PKA	proteína quinasa A
PKB	proteína quinasa B
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLD 1	fosfolipasa D isoforma 1
pmol	picomol
PMSF	fluoruro de fenilsulfonilmetano
PPARα	receptor nuclear alpha activado por proliferadores de peroxisoma

Pro.....	prolina
LSD	<i>Least Significant Differences</i>
p/v	porcentaje de masa-volumen
Rab4.....	proteína vinculada con Ras
RCP-TR	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
Rho.....	<i>rhodopsin</i>
seg	segundos
Ser.....	serina
SH2	Scr homología 2
SPSS.....	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
T	tween-20
TBS	tampón tris-salino
TG	transporte de glucosa
T-TBS.....	tampón tris-salino con tween-20
T-TBS-LD.....	TBS con leche desnatada y tween-20
T-TBS 5 % BSA	TBS con BSA y tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetra metil-etilendiamida
Thr	treonina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
UDP.....	uracil difosfato
U.....	unidad
UI.....	unidad internacional
V.....	voltio
Val	valina
veces-DT2-control	veces–aumentado respecto del control en los pacientes DT2
veces-N	veces–respecto de los sujetos normales
veces-N-control	veces–aumentado respecto del control en los sujetos normales
veces-OB-control.....	veces–aumentado respecto del control en los pacientes OB
v/v.....	volumen de concentración
µg	microgramo
µl	microlitro
Δ.....	incremento
%.....	porcentaje
%Δ DT2-control	%Δ sobre control en los pacientes DT2
%Δ N	% respecto de los sujetos normales
%Δ N-control	%Δ sobre control en los sujetos normales
%Δ OB-control.....	%Δ sobre control en los pacientes OB
¹²⁵ I	Iodo 125

RESUMEN

La obesidad mórbida es una enfermedad crónica que se caracteriza por una excesiva acumulación de grasa, y que suele ir asociada con una menor tolerancia a la glucosa, resistencia a la acción de la insulina en el músculo, y con hiperinsulinismo en ayunas y postprandial, degenerando, con frecuencia, en un periodo variable en función del individuo, en diabetes tipo 2.

Diversos estudios afirman que la disrupción del Receptor Bombesina Subtipo 3, –proteína de membrana sin ligando natural conocido, es decir, receptor huérfano– es el origen de alteraciones de carácter metabólico, como la obesidad.

Por otro lado, el músculo esquelético, en el que se expresa el receptor BRS-3, es clave en el metabolismo de la glucosa, convirtiéndose así en el tejido idóneo para el análisis de su implicación en el metabolismo del azúcar en el hombre normal, en el paciente obeso y en el diabético tipo 2.

Los resultados de este estudio documentan que el BRS-3 está expresado en el músculo de sujetos normales, en menor media en el de pacientes obesos, y aún menos, en el de pacientes diabéticos tipo 2. Además, el BRS-3-AP incrementa la expresión del propio receptor y la del glucotransportador 4, la actividad de enzimas de señalización celular, el transporte de glucosa, la actividad glucógeno sintasa *a* y la síntesis de glucógeno. Finalmente, las células de pacientes obesos, y aún más las de diabéticos tipo 2, parecen ser más sensibles al BRS-3-AP, en comparación con las de sujetos normales.

En definitiva, los resultados de este trabajo demuestran la implicación del BRS-3 en la obesidad y en la diabetes. Un amplio conocimiento de este receptor y/o sus péptidos agonistas, puede establecer las bases necesarias para su utilización como diana terapéutica en esas patologías.

SUMMARY

Morbid obesity is a chronic disease characterized by excessive accumulation of fat, which is frequently associated to low glucose tolerance and insulin resistance in muscle tissue, as well as to hyperinsulinism in fasting and postprandial state, degenerating, in a variable period of time depending upon the patient, in a type 2 diabetes.

Several studies have shown that a disruption of the Bombesin Receptor Subtype-3 –a membrane protein of unknown natural ligand, that is to say, an orphan receptor– could be the origin of metabolic alterations such as obesity.

Furthermore, the skeletal muscle, which expresses the BRS-3 receptor, is a key factor in its sugar metabolism, making the muscle a suitable tissue for the analysis of its role in the human glucose metabolism.

The results of this study, performed in human skeletal muscle, show that the BRS-3 receptor is expressed in normal subjects, to a lower than normal extent in obese, and also, although in an even lower degree, in type 2 diabetic patients. In addition, BRS-3-AP, stimulates the expression of BRS-3 and glucotransporter 4, the protein kinases activity, the glucose transport, glycogen synthase a activity and glycogen synthesis. Finally, the cells from obese patients, and particularly those from type 2 diabetics, seem to be more sensitive to this analogue than those from normal subjects,

In conclusion, the results of this study demonstrate the implication of the BRS-3 receptor in obesity and diabetes syndromes. The BRS-3 receptor and/or its agonist peptide could be used as a molecular target in the therapy of obesity and diabetes.

INTRODUCCIÓN

¿Qué tienen en común Kim Dotcom –creador de Megaupload–, Papá Noel, el gato Garfield y Vernon Dursley –tío de Harry Potter–?...Todos ellos son obesos (**Fig. 1**).

A lo largo de la historia, los estereotipos vinculados a la obesidad se han ido modificando (**Fig. 1**). En las culturas prehistóricas mediterráneas, la obesidad estaba asociada con la fertilidad, la fuerza y el atractivo físico. Al inicio de la Edad Moderna,



Figura 1. Papá Noel, gato Garfield, Tío Vernon y Harry Potter, Venus de Lespugue, General toscano Alessandro del Borro e icono de una cadena de restaurantes de comida rápida.

en Europa, la obesidad era considerada símbolo de riqueza y estrato social, puesto que ello permitía al individuo escapar de las grandes hambrunas de la época. Sin embargo, el cambio más drástico se está produciendo en la actualidad,

cuando el cuerpo obeso es ampliamente considerado como antiestético. Además, la

realidad es que, en los países desarrollados, la obesidad se está convirtiendo en un notable problema de salud pública, que en gran medida está originado por una excesiva ingestión de alimentos de alta densidad calórica, en combinación con falta de ejercicio físico (Spiegelman y Flier 2001; Maudsley, Martin y col. 2011). Pero, ¿qué es la obesidad y qué la origina?

La **obesidad** es una alteración crónica de origen multifactorial, que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo, y que predispone al desarrollo de apnea del sueño, ictus, osteoartritis, así como a algunas formas de tumores, entre ellos el cáncer de riñón o de mama (Alegria Ezquerro, Castellano Vázquez y col. 2008; Grundy, Brewer y col. 2004; Maudsley, Martín y col. 2011; Polednak 2003; Spiegelman y Flier 2001). Además, la obesidad está íntimamente relacionada con el síndrome metabólico –identificado por una combinación de acumulo de grasa, dislipemia, resistencia a insulina, disfunción endotelial e inflamación–, y con la diabetes tipo 2. Estas tres

patologías, no solamente comparten mecanismos de aparición y de evolución, sino que, en determinados pacientes, pueden combinarse sucesivamente, provocando serias complicaciones cardiovasculares (Alegría Ezquerro, Castellano Vázquez y col. 2008; Grundy, Brewer y col. 2004).

La Organización Mundial de la Salud –OMS–, en función del índice de masa corporal –IMC, kg/m^2 –, clasifica la obesidad en tres categorías diferentes: la clase I, IMC de 30-35; la clase II, IMC de 35-40 y, por último, la clase III, IMC de ≥ 40 . Esta última, que también recibe el nombre de obesidad severa o mórbida, es una anomalía crónica normalmente irreversible, generalmente asociada con una menor tolerancia a la glucosa, con resistencia a la acción de la insulina en el músculo y en la grasa, y con hiperinsulinismo tanto en el ayuno como durante el postprandium (Inoue 1990).

En la actualidad, el tratamiento de la obesidad está basado en una dieta hipocalórica, acompañada de ejercicio; pero cuando se trata de obesidad mórbida, la terapia es más compleja, debido a que estos pacientes no responden con facilidad a ningún tratamiento médico, dietético o de conducta (Spiegelman y Flier 2001; Maudsley, Martin y col. 2011). En este caso, el procedimiento a seguir es, por el momento, la cirugía bariátrica, que se puede llevar a cabo mediante tres técnicas diferentes: a) la restrictiva, que induce la pérdida de peso por reducción del tamaño o la capacidad gástrica, limitando drásticamente la ingestión de alimentos; b) la malabsortiva, que reduce el peso mediante un acortamiento del intestino delgado, y que disminuye la superficie y capacidad absorbente, acelerando el tránsito intestinal; sin embargo, esta técnica es excepcionalmente aplicada, por el alto riesgo de complicaciones posteriores por mal nutrición o cirrosis hepática debida a sobrecrecimiento bacteriano–, y c) las mixtas, que son una combinación de las dos anteriores, por lo que se reduce y modifica la capacidad gástrica, y se interrumpe la absorción de nutrientes. Dentro de esta última categoría, se incluye el bypass gástrico que, probablemente, sea lo más utilizado actualmente (Noria y Grantcharov 2013; Maggard, Shugarman y col. 2005).

Uno de los factores frecuentemente asociados a la obesidad, con independencia de la clase, es el de resistencia a la insulina, caracterizado por un deterioro en la capacidad de respuesta de la célula a la hormona, y que, por tanto, no solo resulta en una captación de glucosa deficiente, sino que provoca una hiperrespuesta de la célula β ; pero esta no puede mantener indefinidamente esa hiperactividad, por lo que, con el

tiempo, ello aboca a una disfunción, primero, y ulterior muerte –diabetes tipo 1– de la célula (Beck-Nielsen y Groop 1994; Turner y Clapham 1998). La resistencia a la insulina, con un estado de hiperinsulinemia sostenida, está ya presente en personas, generalmente obesas, décadas antes de que se manifieste una diabetes tipo 2 (Lillioja, Mott y col. 1993; Després, Lamarche y col. 1996; Smith 1996).

La **diabetes tipo 2**, patología muy asociada a la obesidad, es la enfermedad metabólica más frecuente, y la resistencia a la insulina predice su futuro desarrollo. Además, es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal y enfermedad vascular periférica en el adulto. Al margen de que puedan existir factores genéticos que determinen el riesgo a padecerla –como los relacionados con las alteraciones en la vía de señalización celular de la insulina–, se desconoce el origen de los defectos en la acción o secreción de la hormona, que abocan al individuo a un estado diabético (Goldstein 2003; Kahn 2003; Grundy, Brewer y col. 2004).

La regulación de los niveles de glucosa circulantes, que deben mantenerse próximos a 4,5 mM (Harris y Crabb 1997), requiere de la acción combinada de tres hormonas fundamentales: la insulina, que activa la señal específica en los tejidos –principalmente en el hígado, en el músculo y en la grasa– para que la hexosa sea retirada de la circulación y convertida en producto de almacenamiento –glucógeno y triacilglicéridos–; el glucagón, que señala sobre una glucemia demasiado baja, y los tejidos correspondientes responden produciendo glucosa, bien por ruptura de glucógeno o por gluconeogénesis, u oxidando grasas para reducir el consumo del azúcar; y, por último, la epinefrina, que en el caso del músculo, estimula la glucogenolisis y la glucólisis (Harris y Crabb 1997).

La insulina es secretada, fundamentalmente, bajo el estímulo de la glucosa sanguínea, y regula el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos en numerosos tejidos. La concentración de la hormona en sangre varía en función de la glucemia, convirtiéndose en el mensajero hormonal que señala su disponibilidad. La insulina que, entre otras acciones, estimula el transporte de glucosa, la actividad glucógeno sintasa *a* y la síntesis de glucógeno (Acitores, González y col. 2004; Cushman y Wardzala 1980; González, Acitores y col. 2004; Klip, Ramlal y col. 1986; Luque, González y col. 2002; Suzuki y Kono 1993), se convierte en el elemento principal del mecanismo controlador de la

homeostasis del azúcar, conduciendo su efecto metabólico a la regulación de su utilización y acumulación por parte de los tejidos.

La importancia fisiológica de la insulina es tal, que ha sido una de las proteínas más estudiadas; de hecho, fue la primera en ser secuenciada (Sanger 1959), la primera en ser sintetizada químicamente (Katsoyannis 1963), y también la primera proteína recombinante para uso clínico (Goeddel, Kleid y col. 1979). El paso inicial en la acción de la insulina, una vez secretada, es la unión a su receptor en el tejido diana (Ebina, Ellis y col. 1985; Ullrich, Bell y col. 1985). Este receptor de membrana, cuya estructura fue descrita en 1985 (Czech 1985), es una glucoproteína integrada en la membrana celular, constituida por dos subunidades α y dos β (**Fig. 2**), unidas entre sí por enlaces covalentes de tipo disulfuro. En esta unión se forman heterodímeros α - β que, a su vez, están asociados por el mismo tipo de puentes disulfuro, constituyendo un tetrámero α_2 - β_2 (Czech 1985). El receptor de insulina se expresa en una gran cantidad de tejidos de los mamíferos, si bien lo hace mayoritariamente en el músculo, tejido adiposo e hígado (Cheatham y Kahn 1995).

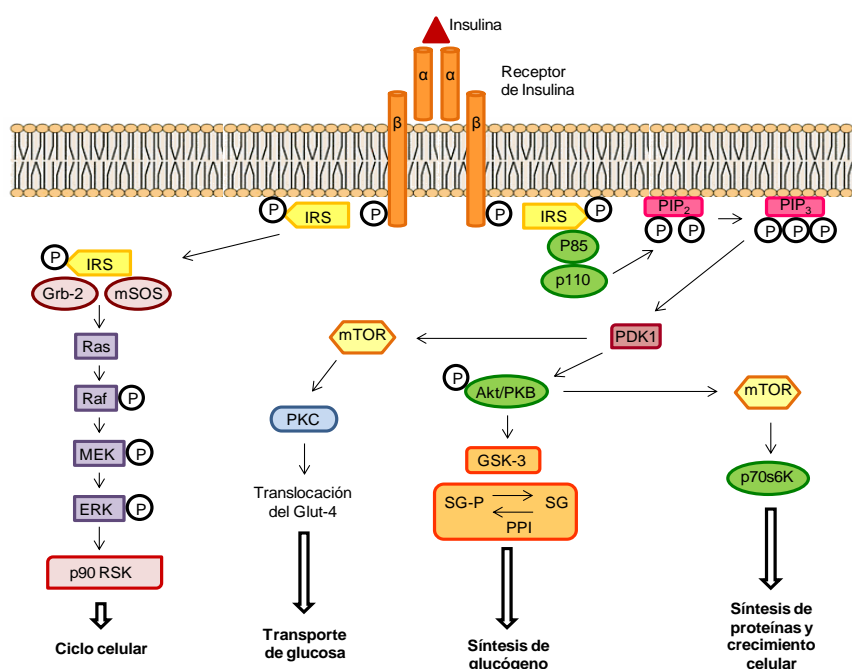


Figura 2. Posibles vías de señalización de la insulina.

Cuando la insulina se une a la subunidad α de su receptor (**Fig. 2**), se produce un cambio conformacional que resulta de la activación de la quinasa de la subunidad β (Herrera y Rosen 1986; Baron, Kaliman y col. 1992); ello conduce a la transferencia de grupos fosfatos desde adenosín trifosfato –ATP– a múltiples residuos tirosina del propio receptor, y a la fosforilación de proteínas sustrato intracelulares –IRSs– que se relacionan con proteínas que contienen dominios Src homología 2 –SH₂– (Taha y Klip 1999), cuya asociación activa las principales vías de señalización celular. La existencia de una gama de distintas proteínas IRSs, así como la de otras intermediarias, ofrece un sinfín de posibles mecanismos mediante los cuales la insulina puede ejercer su acción, y que resultan en una compleja ramificación de las vías de acción de la hormona en células sensibles a esta.

La mayoría de los efectos de la insulina son dependientes de la presencia de glucosa en el medio, cuyo proceso de captación está mediado por unas proteínas de 45-55 KDa: los glucotransportadores –Gluts– (Brown 2000). Estos pertenecen a una familia de proteínas transportadoras de azúcares y otros compuestos orgánicos (Marger y Saier 1993; Brown 2000), con una amplia distribución filogenética. Existen varias isoformas de glucotransportadores, los cuales difieren entre sí en sus características cinéticas y especificidad de tejido.

De todo el conjunto de glucotransportadores, el Glut-1, ampliamente distribuido, es considerado como el responsable del transporte de glucosa basal (Baldwin 1993). Específicamente en el músculo, tejido clave en los procesos relacionados con la metabolización del azúcar, se expresa el Glut-4 (Fukumoto, Kayano y col. 1989), donde representa el 90 % del total de glucotransportadores (Kahn 1996; Kandror y Pilch 1996) y es responsable del transporte de glucosa dependiente de insulina, que se produce tras la translocación (**Fig. 3**), desde el interior celular a la membrana plasmática, de vesículas membranosas con alto contenido en Glut-4 (Zorzano, Wilkinson y col. 1989), deteniéndose el proceso cuando el transportador se interna de nuevo (Cushman y Wardzala 1980; Karlsson, Chibalin y col. 2009). Además de la insulina (Guma, Zierath y col. 1991), varios factores, así como otros agentes, inducen la translocación del glucotransportador; por ejemplo la contracción muscular (Lund, Holman y col. 1995) o su estimulación eléctrica (Roy, Johannsson y col. 1997), la propia glucosa (Goodyear, Hirshman y col. 1996), y agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas (Pulido, Romero y col. 1996). En el

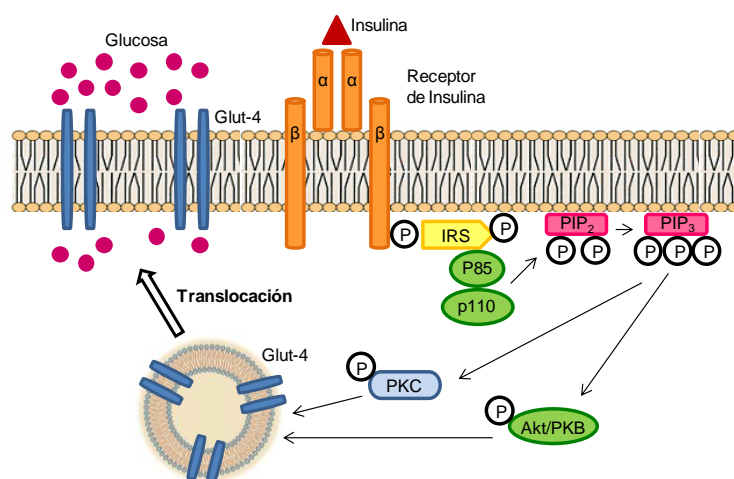


Figura 3. Translocación del Glut-4.

caso de la insulina, promotora de captación de glucosa por células sensibles a la hormona, parece ser clave un incremento en la actividad fosfatidilinositol 3 kinasa –PI3K– (Shepherd, Withers y col. 1998); pero aunque suficiente para su inicio, no se consigue con ello una activación completa del transporte (Frevort y Kahn 1997), por lo que algunos autores creen en la necesaria participación de una segunda ruta de señalización (Isakoff, Taha y col. 1995). Así, aunque el mecanismo de translocación del Glut-4 no es aún del todo conocido, sí se ha demostrado que la PI3K puede activar otras enzimas como la proteína quinasa B –PKB– o la C –PKC– (Litherland, Hajdуч y col. 2001); además moléculas como la fosfolipasa C –PLC–, la isoforma 1 de la fosfolipasa D –PLD1–, o la proteína vinculada con Ras –Rab4– (Imamura, Huang y col. 2003; Van Epps-Fung, Gupta y col. 1997), podrían también estar involucradas en el proceso. Otros investigadores han propuesto que la translocación del Glut-4 pudiera estar mediada por determinados miembros de la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G –GPCR– (Song, Zheng y col. 2001; Malbon 2004).

Cuando una molécula se une a su receptor específico en una célula sensible, como es el caso de los GPCR, se genera un cambio conformacional en el dominio intracelular del receptor, que afecta a su interacción con la segunda proteína en la vía de la transducción de señal; esta, que es una proteína G estimuladora heterodimérica,

se activa y, en función de las subunidades que la conformen, a su vez pone en marcha otras vías (**Fig. 4**): la $G_{\alpha s}$ activa a la adenilato ciclasa –AC– y regula los canales de calcio; la $G_{\alpha i}$ activa la fosfodiesterasa e inhibe a $G_{\alpha s}$; la $G_{\alpha q}$ aumenta la actividad de PLC; y, la $G_{\alpha_{12}}$, que produce la activación de los factores de intercambio Rho –GEF– (Helmreich y Hofmann 1996; Hamm 1998).

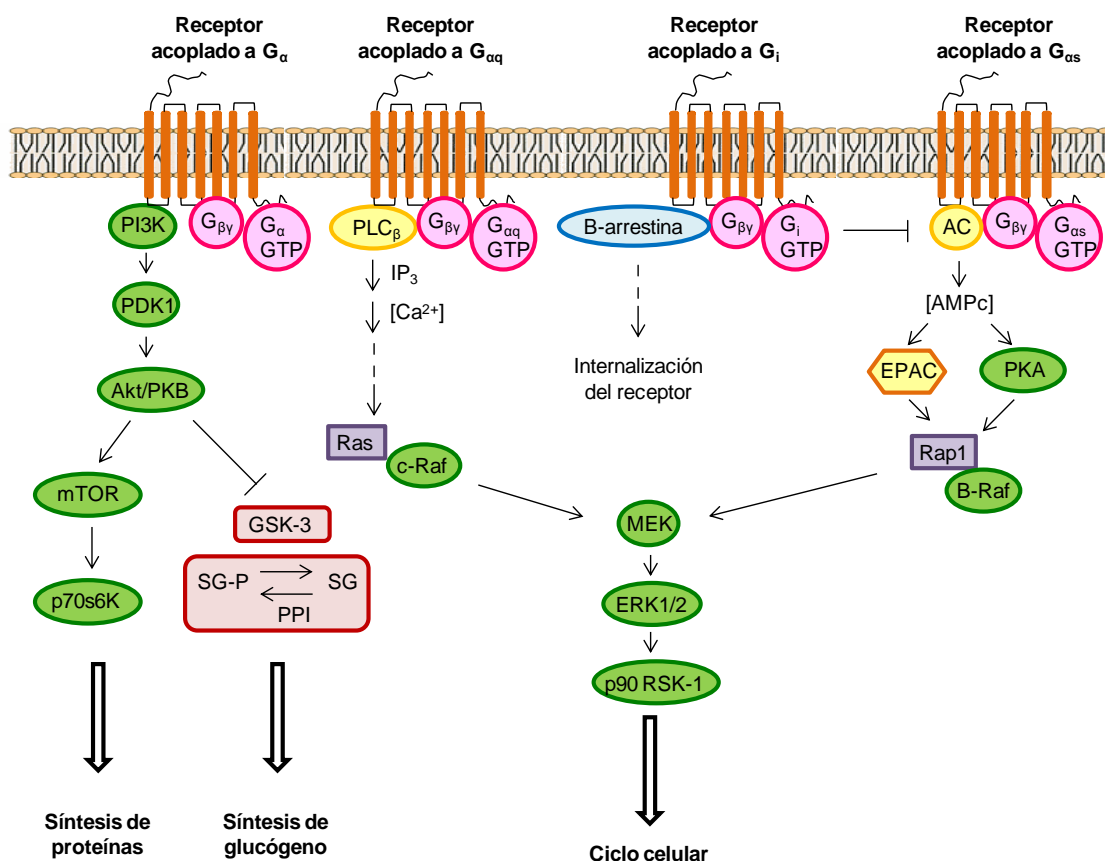


Figura 4. Señalización intracelular mediada por GPCR.

Los GPCR están relacionados con diferentes procesos fisiológicos como el metabolismo lipídico (Carel, Le Stunff y col. 1999), los sentidos de vista (Filipek, Stenkamp y col. 2003) y olfato (Ronnelt y Moon 2002), el comportamiento y estados de ánimo (Moody y Merali 2004), la activación del sistema inmune e inflamación (He, Gurunathan y col. 2000), el sistema nervioso (Tanaka, Nakagawa y col. 2000), la homeostasis neuroendocrina (Moody y Merali 2004; Hazell, Hindmarch y col. 2012), y también con el desarrollo de algunos tipos de tumores, tales como el de páncreas y el de próstata (Daaka 2004; Szepeshazi, Schally y col. 2005). De hecho,

su relevancia es tal, que se han convertido en diana molecular para más de un 30 % de los fármacos del mercado (Salon, Lodowski y col. 2011; Hutchinson, Summers y col. 2008).

Un gran número de situaciones patológicas, como la obesidad y la diabetes, están relacionadas con cambios en la funcionalidad de los GPCR (Maudsley, Martin y col. 2011; Hutchinson, Summers y col. 2008). Uno de los miembros incluidos en esta familia de receptores, sugerido como implicado en el origen de anomalías en la homeostasis de la glucosa, es el **Receptor Bombesina Subtipo 3 –BRS-3–**; de hecho, diversos trabajos han informado de que la inhibición del gen que codifica el receptor sería responsable del origen de alteraciones metabólicas que, entre otras disfunciones, provocaría obesidad (Ohki-Hamazaki, Watase y col. 1997; Matsumoto, Yamada y col. 2003).

El receptor huérfano –sin ligando natural conocido– BRS-3, clonado en 1992 del útero de cobaya, es una proteína de siete dominios transmembrana con 399 aminoácidos, y está asociado a una proteína $G_{q/11}$ (Gorbulev, Akhundova y col. 1992; Jensen, Battey y col. 2008). En el hombre, el gen que codifica su expresión está localizado en la región cromosómica Xq26 (Ross, Grafham y col. 2005), con un tamaño de 4,5 Kb, y está formado por tres exones y dos intrones (Hubbard, Aken y col. 2007).

El BRS-3 pertenece a la familia de los receptores bombesina, de los que toma su nombre. El péptido bombesina está constituido por 14 aminoácidos (Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂), y se aisló, por vez primera, de la piel de la rana europea *Bombina bombina* (Erspamer, Erpamer y col. 1970). Dentro de esta familia, también se incluyen el receptor del péptido liberador de gastrina –GRPR– y el de la neuromedina B –NMBR–, con los que el BRS-3 comparte una homología de secuencia del 51 y 47 %, respectivamente (Gorbulev, Akhundova y col. 1992; Fathi, Corjay y col. 1993; Jensen, Battey y col. 2008). Los receptores GRPR y NMBR, ambos presentes en mamíferos, y ampliamente distribuidos, principalmente por el sistema nervioso central –SNC– y tracto intestinal, tienen por ligandos naturales el péptido liberador de gastrina –GRP– y la neuromedina B –NMB– (Minamino, Kangawa y col. 1983), por los que presentan una alta afinidad (K_i -8 y -4 nM, respectivamente) y selectividad (Frucht, Gazdar y col. 1992; Moody, Staley y col. 1992; Benya, Kusui y col. 1995), y está descrito que, tras la unión a su receptor respectivo (Spindel, Giladi y col. 1990; Battey, Way y col. 1991), modulan el metabolismo y los procesos endocrinos y exocrinos (McDonald, Jörnvally col. 1979).

El lugar de localización de la expresión del gen del receptor BRS-3 es dependiente de la especie. De hecho, en el mono, el BRS-3 se expresa abundantemente en el hipotálamo, glándula pituitaria, amígdala, hipocampo y testículo (Sano, Feighner y col. 2004); en la rata, se ha detectado en el testículo y en la fase secundaria de maduración de los espermatozoides, pero no está presente en la células de Sertoli ni en los diferentes estadios de maduración de la espermatogénesis (Fathi, Corjay y col. 1993); en el carnero, se ha descrito en el hipotálamo (Whitley, Moore y col. 1999) pero no en el testículo; además, se ha documentado que el BRS-3 existe en el islote pancreático del ratón pero no en el de la rata (Feng, Guan y col. 2011). Por otro lado, también en el mono, se ha detectado ácido ribonucleico mensajero –ARNm– del receptor BRS-3 en el páncreas, en el tiroides y en el ovario; sin embargo, no se detectó en el resto de tejidos, mostrando con ello una distribución muy distinta a la de los receptores de su misma familia, el GRPR y el NMBR (Fathi, Corjay y col. 1993; Sano, Feighner y col. 2004).

En el hombre, el receptor BRS-3 se expresa mayoritariamente en el cerebro, en el músculo cardíaco y en los islotes pancreáticos (Su, Cooke y col. 2002; Jensen, Battey y col. 2008; Feng, Guan y col. 2011); en el músculo esquelético, se han detectado niveles importantes de ARNm del receptor BRS-3, mientras que en el riñón y en la piel es prácticamente indetectable (www.genecards.org). Además, el BRS-3 ha sido localizado en distintos tipos de tumor, como el de pulmón (Fathi, Corjay y col. 1993; Reubi, Wenger y col. 2002), ovario y próstata (Sun, Schally y col. 2000; Sun, Halmos y col. 2000), y en el sarcoma de Ewing (Reubi, Wenger y col. 2002). Por último, este receptor está relacionado con la fisiología reproductiva (Reitman, Dishy y col. 2012), el sistema respiratorio (Liu, Tan y col. 2011; Tan, Qin y col. 2007) y el metabolismo celular (Feng, Guan y col. 2011).

En lo que se refiere a la farmacología del BRS-3, esta está escasamente documentada en la literatura, quizás debido a que se desconoce su ligando natural. En uno de los primeros estudios relativos a la búsqueda de posibles agonistas de este receptor, llevado a cabo en la línea de fibroblastos de ratón –Balb-3T3–, transfectada con el receptor humano BRS-3, se demostró que la farmacología del BRS-3 es única, y que ninguno de los ligandos naturales de la familia bombesina –bombesina, ranatensina, litorina, GRP y NMB– activaba dicho receptor, al ser necesarias concentraciones superiores a 1 μ M para producir una movilización de calcio intracelular (Wu, Nitecki y col. 1996). Mantey y col. (1997), en un trabajo realizado en esa

misma línea celular–Balb-3T3– y en otra de cáncer de pulmón humano –NCI-H1299–, dirigido al estudio de la capacidad de distintos compuestos sintéticos, entre los que se incluyeron aquellos que eran una modificación estructural de la bombesina, informaron que el péptido **[D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14}**, al que llamaremos **BRS-3-AP**, tenía una alta afinidad (K_i -9 y -4 nM, respectivamente) y potencia para activar el BRS-3 (Mantey, Weber y col. 1997). La posible explicación de esta afinidad estribaría en la presencia, por un lado, de la penúltima fenilalanina –los ligandos con esa sustitución tienen una afinidad mayor a la de aquellos con una leucina en la posición 13 (K_i ->10.000 y -1.100-7.600 nM, respectivamente)–; y, por otro, de la presencia de β-Ala¹¹, ya que los agonistas carentes de ese aminoácido, presentan una reducción (K_i ->10.000 y -1.400->10.000 nM, respectivamente) en la afinidad por el BRS-3 (Mantey, Weber y col. 1997; Ryan, Weber y col. 1998b). Sin embargo, el BRS-3-AP, también mostró ser afín a los receptores GRPR y NMBR (K_i -1 y -5 nM respectivamente), es decir, no es específico para el receptor BRS-3 (Mantey, Coy y col. 2002; Mantey, Weber y col. 1997; Pradhan, Katsuno y col. 1998; Reubi, Wenger y col. 2002).

A partir de estos hallazgos, se han ido generando nuevos ligandos sintéticos del BRS-3 que, como requisito, debían de ser, al menos, tan afines por el receptor como el BRS-3-AP. Entre ellos destacan, a) el **[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14}** –péptido 1–, que únicamente difiere del BRS-3-AP en la tirosina de la posición 6; lo cual permite la incorporación de ¹²⁵I (González, Hocart y col. 2008; Pradhan, Katsuno y col. 1998); b) el **Ac-Phe-Trp-Ala-His (tBzl)-Nip-Gly-Arg-NH₂**, que es una modificación por una sustitución y también cambio de posición de aminoácidos que conforman el BRS-3-AP, porque se pensaba que la presencia de Arg en la posición 13 y, en particular, la de Nip en la 11 y la de Gly en la 12, podría producir, como así fue, un aumento de la potencia y selectividad de este nuevo ligando sintético por el receptor BRS-3 (Boyle, Humphries y col. 2005); c) el **[D-Try⁶, (R)-Apa¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14}** –péptido 2–, el **[D-Try⁶, (R)-Apa¹¹, 4Cl-Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14}** –péptido 3–, el **Ac-Phe-Trp-Ala-His(tBzl)-Nip-Gly-Arg-NH₂** –péptido 4–, que tienen diferente afinidad por el receptor (González, Hocart y col. 2008); d) el **N1-(2-feniletil)-(2R)-2-([(1S)-1-(benzylcarboxamido)etil]carboxamido)-3-(1H-3 indolil)propanamida –16a–**, que favorece la translocación de β-arrestina a la membrana plasmática, permitiendo la internalización del receptor (Zhang, Nothacker y col. 2009); e) el **2-(4-{2-[5-(2,2-dimetilbutil)-1H-imidazol-2-yl]etil}fenil)piridina –Bag-1–**, que disminuye el peso corporal al reducir la ingestión de alimentos (Guan, Chen

y col. 2010) y que activa la secreción de insulina estimulada por glucosa –GSIS– y el metabolismo del azúcar (Feng, Guan y col. 2011), y e) el (2S)-1, 1, 1-trifluoro-2-[4-(1H-pirazol-1-yl)fenil]-3-(4-{[1- (trifluorometil)ciclopropil]metil}-1H-imidazol-2-yl)propan-2-ol –MK-5046–, que ha sido testado tanto en modelos experimentales como en el hombre (Guan, Metzger y col. 2011; Reitman, Dishy y col. 2012).

El MK-5046, en el ratón, en la rata y en el perro, reduce el peso, aumenta la tasa metabólica, la temperatura, el ritmo cardiaco y la presión sanguínea (Guan, Metzger y col. 2011); no obstante, estos efectos, secundarios, se extinguen de forma natural tras dosis continuadas (Guan, Metzger y col. 2011). Además, el MK-5046, en un estudio realizado en varones, sanos y obesos, mostró que en administración oral (10-160 mg), aumenta, transitoriamente, la presión arterial, y produce erección, sensación de frío y calor, y nerviosismo, y todos estos efectos, que son secundarios, coinciden con la máxima concentración del agonista en plasma, desapareciendo estos tras una segunda dosis. Sin embargo, no se observaron cambios en la temperatura corporal, ritmo cardiaco, glucemia o sensación de saciedad (Reitman, Dishy y col. 2012).

Por otra parte, en un trabajo llevado a cabo por Ida y col. (2012), en la *Drosophila melanogaster*, se purificó un ligando –CCHamida-2– de un receptor GPCR del mismo subgrupo filogenético que el BRS-3, capaz de regular el apetito y la metabolización del azúcar; no obstante, aunque todavía no se han descrito los efectos directos de este ligando sobre el BRS-3, este tipo de estudios abundan en el conocimiento de posibles agonistas de este receptor (Ida, Takahashi y col. 2012).

A pesar de la existencia de estos ligandos sintéticos, las bases moleculares que permiten que estos agonistas, y en concreto el BRS-3-AP, tengan una alta afinidad, potencia y selectividad por los receptores de la familia bombesina y, en particular, por el BRS-3, están escasamente descritas; de hecho, la información disponible procede de estudios de mutagénesis dirigida. Específicamente, Liu y col. (2002), sustituyendo individualmente los dominios extracelulares del receptor BRS-3 de rata por los del receptor humano BRS-3, informaron de que las variaciones en el tercer dominio extracelular suponían una mimetización, aunque parcial, de la potencia de activación del péptido [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bombesin₆₋₁₄ –de baja afinidad por el BRS-3 de rata– en el BRS-3 humano (Liu, Lao y col. 2002).

En otro estudio, en el que se partió de la premisa de que ningún cambio en la secuencia de los aminoácidos que conforman el BRS-3, afecta directamente a la afinidad que el BRS-3-AP tiene por este receptor, ha permitido identificar otros dominios y secuencias claves del BRS-3 en la selectividad de otros ligandos. De hecho, la sustitución de una arginina en la posición 127 por una glutamina en el tercer dominio transmembrana del BRS-3 humano –BRS-3*, IC₅₀: 0,0022 µM–, no modifica la afinidad que el BRS-3-AP tiene por el BRS-3 –IC₅₀: 0,0027 µM–. Además, sustituyendo los dominios extracelulares del BRS-3* por los equivalentes en el receptor GRPR de rata, y viceversa, y utilizando el agonista BRS-3-AP y los péptidos 4, 3 y 2, se demostró: a) que alteraciones en el segundo dominio extracelular del BRS-3*, y sus regiones adyacentes, eran importantes en la pérdida de afinidad del péptido 4; b) que cambios en el tercero y, en menor medida, en el segundo dominio extracelular del BRS-3*, disminuyen la afinidad del péptido 3; c) que variaciones en el tercer dominio extracelular del BRS-3*, alteran la afinidad del péptido 2; d) que la activación de BRS-3* por BRS-3-AP, produce una mayor generación de inosítoles fosfato –IP₃– que la obtenida con el péptido 4 –EC₅₀: 0,012 y 0,14 µM, respectivamente–, y e) que la His¹⁰⁷, localizada en el segundo dominio extracelular del BRS-3*, es esencial para la activación del receptor, sugiriendo, además, uniones del tipo amino-anillo aromático entre el ligando y el receptor (González, Hocart y col. 2008).

Por otro lado, por resultados de un trabajo, en el que se utilizó el agonista [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bombesin_{6–14}, y en el que distintos aminoácidos del GRPR fueron sustituidos por los equivalentes del receptor colecistoquinina tipo 2 –CCK_AR, por el que este ligando tiene baja afinidad–, se postuló que la alta afinidad de [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bombesin_{6–14} por el GRPR se debe al segundo y cuarto dominio extracelular, a la sexta región transmembrana, y a la interacción de una carga positiva del cuarto dominio extracelular con una negativa del segundo (Uehara, Hocart y col. 2012).

Tras la unión del ligando al receptor, se desencadena la señalización celular. En el caso del BRS-3, la activación de este receptor, producida por el agonista BRS-3-AP, aumenta la actividad de las PLC y PLD, lo que genera IP₃, una movilización de calcio intracelular, un aumento del metabolismo celular pero no su crecimiento y, por último, un incremento en la actividad de la proteína de adhesión p125^{FAK}, independiente de AC (Ryan, Weber y col. 1998a; Ryan, Weber y col. 1998b). Otros investigadores, en una línea

celular de cáncer de pulmón humano –NCI-1299–, transfectada con el BRS-3, documentaron que el BRS-3-AP estimula *Ets like gene 1* –Elk-1–, de manera dependiente de la proteína quinasa mitogénicamente activa 1 –MEK-1–, lo que tuvo como resultado un aumento en la expresión de ARNm de c-fos (Weber, Walters y col. 2001). Además, en un estudio realizado en NCI-N417, que expresa de forma nativa el receptor BRS-3, se sugirió que la activación del receptor BRS-3 por BRS-3-AP estimula la formación de la proteína de adhesión local p125^{FAK}, contribuyendo a acelerar el crecimiento del tumor y su metástasis (Hou, Wei y col. 2006). Por último, Qin y col. (2012), utilizando una línea de fibroblastos de ratón –BALB 3T3–, y otra línea celular de cáncer de pulmón humano –NCI-H1299–, ambas transfectadas con el BRS-3, y diferentes agonistas del receptor, entre los que destaca el [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bombesin_{6–14}, han demostrado que la activación del BRS-3 media la fosforilación de *cAMP Response Element Binding protein* –CREB– y su transactivación, a través de la proteína quinasa A –PKA–, la C –PKC– y MEK-1 (Qin, Qu y col. 2012).

Si bien se ha avanzado en el conocimiento del BRS-3, su implicación, tanto en condiciones fisiológicas normales como patológicas, es apenas conocida. No obstante, los escasos trabajos existentes, relativos a la función de este receptor, en los que se ha empleado un modelo de ratones deficientes del mismo, han informado de que estos animales desarrollan obesidad leve asociada con hipertensión y alteración en el metabolismo de la glucosa, y que ello cursa en paralelo con una reducción en la tasa metabólica, aumento en la ingestión de alimentos, incremento en la concentración de leptina circulante e hiperfagia celular (Ohki-Hamazaki, Watase y col. 1997). Además, estos ratones tienen valores de insulina en suero más alto de lo normal (Matsumoto, Yamada y col. 2003), y presentan, en el islote pancreático, un contenido en insulina, y tamaño y número de islotes, disminuido; sin embargo, el ritmo de biosíntesis de la hormona se mantiene en niveles normales (Nakamichi, Wada y col. 2004). Por otro lado, en el adipocito, la translocación del Glut-4 a la membrana es deficiente, por lo que la alteración detectada en el metabolismo de la glucosa en estos animales, puede ser debida a un fallo en la translocación del Glut-4 a la membrana en el adipocito y también al estrés generado en la célula β pancreática (Nakamichi, Wada y col. 2004). Estos ratones deficientes de BRS-3 cursan con hiperleptinemia y resistencia a la leptina inducida por la hormona concentradora de melanina –MCH–, lo que sugiere

que la inhibición del gen afecta al mecanismo por el cual la leptina reduce la expresión del receptor para MCH, y explica el hecho de que este esté sobreexpresado en esos animales (Maekawa, Quahy col. 2004). Por otra parte, los ratones deficientes del receptor mostraron tener alteraciones en el sentido del gusto, al expresarse dicho receptor en el núcleo centromedial de la amígdala cerebral y en el núcleo hipotalámico (Yamada, Wada y col. 1999). Finalmente, en este modelo experimental, se observó que cambios en la expresión del BRS-3 en el SNC, pueden afectar a los mecanismos neuronales relacionados con el comportamiento (Yamada, Ohki-Hamazaki y col. 2000).

Otros estudios han puesto de manifiesto que el receptor nuclear α activado por proliferadores de peroxisoma –PPAR α –, y el complejo adaptor relacionado con la proteína 2 α –AP-2 α – aumentan la expresión del receptor BRS-3 en situaciones de estrés oxidativo (Tan, Qin y col. 2007). Por otro lado, se ha sugerido que el BRS-3 podría desempeñar una función importante en la reparación del epitelio bronquial (Tan, Qi y col. 2006), ya que la proteína activada por el receptor bombesina –BRAP–, que se localiza en el citoplasma y en la membrana, promueve el ciclo celular y la reparación de ese epitelio (Liu, Tan y col. 2011). Además, se han localizado niveles importante de ARNm del receptor BRS-3 junto con el factor liberador de corticotropina –CRF– y con la hormona liberadora del crecimiento –GHRH–, lo que reafirma la idea de un vínculo del BRS-3 con el estrés y con el crecimiento relacionados con el sistema endocrino (Zhang, Parks y col. 2013).

En resumen, la información derivada de trabajos previos, realizados en modelos animales y líneas celulares, sugieren una participación del receptor BRS-3 en determinadas alteraciones como son las relacionadas con la homeostasis de la glucosa, el sentido del gusto o la tasa metabólica, que parecen conducir al desarrollo de obesidad. No obstante, hasta la fecha, la información sobre este receptor en el hombre es prácticamente nula, si bien hay que destacar dos trabajos: un estudio genético, realizado en pacientes obesos japoneses, en el que se concluyó que, aunque no se detectaban mutaciones o polimorfismos –quizás por una mutación de baja frecuencia del receptor–, no se debía, sin embargo, descartar su existencia (Hotta, Matsukawa y col. 2000); y el otro, en el que se documentó que el BRS-3 regula la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes pancreáticos humanos (Feng, Guan y col. 2011).

En definitiva, la situación actual en el conocimiento del receptor BRS-3 es claramente indicativa de su función en distintos aspectos y sistemas; sin embargo, su postulada implicación en el hombre y en patologías vinculadas con un metabolismo de la glucosa alterado, como la obesidad y la diabetes, es decir, su participación directa en los procesos de metabolización del azúcar en tejidos mayoritariamente implicados en la homeostasis de la glucosa, está por dilucidar.

.

OBJETIVOS

En base al postulado de una posible implicación del BRS-3 en patologías vinculadas con un metabolismo de la glucosa alterado, se hace necesario el estudio de las funciones del BRS-3 en el músculo esquelético de sujetos normales, pacientes obesos y diabéticos tipo 2; y ello, no solo porque en este tejido se expresa el receptor, sino porque el músculo tiene un papel esencial en la metabolización de la hexosa. Además, se sabe que el ligando BRS-3-AP, con alta afinidad por el receptor BRS-3, está relacionado con la activación de vías de señalización celular, lo que lo convierte en un instrumento útil para el estudio de la relación del BRS-3 con el metabolismo de la glucosa en el músculo. Por lo anterior, en este trabajo se ha investigado:

En pacientes obesos y en diabéticos tipo 2, en relación con los sujetos normales...

La expresión del receptor BRS-3 –ARNm y proteína– en fragmentos de músculo esquelético.

En miotúbulos diferenciados de mioblastos:

El efecto del agonista BRS-3-AP del receptor BRS-3, y también de la insulina, sobre la expresión del propio receptor –ARNm y proteína–.

La actividad de quinasas de señalización celular –PI3K/PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1–, posiblemente implicadas en la acción del BRS-3-AP tras su unión al BRS-3.

El papel del BRS-3 en la acción del BRS-3-AP, sobre la expresión del Glut-4 –ARNm y proteína–, y en el transporte de glucosa.

El efecto de la combinación del BRS-3 con el ligando BRS-3-AP, sobre parámetros relacionados con el metabolismo del azúcar.

En miotúbulos procedentes de sujetos normales...

La selectividad del ligando BRS-3-AP por el BRS-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS y MUESTRAS de ESTUDIO

En este trabajo participaron un total de 106 individuos, de los cuales 53 fueron sujetos normales –N; sin alteraciones conocidas del metabolismo de la glucosa–, 26 pacientes obesos –OB–, y 27 pacientes diabéticos tipo 2 –DT2–. En la **tabla 1** se muestran las características metabólicas de los sujetos incluidos en este estudio.

Los pacientes diabéticos tipo 2 participantes en este estudio, recibían una dosis diaria de insulina (9 unidades, NovoRapid® flexpen® 100 U/ml); sin embargo, ni los sujetos normales ni los pacientes obesos estaban bajo medicación alguna.

Tabla 1. Características metabólicas de los sujetos normales –N–, de los pacientes obesos –OB– y de los diabéticos tipos 2 –DT2– incluidos en este estudio.

	Sexo (M/H)	Edad (Años)	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	IMC (Kg/m ²)	HbA _{1c} (%)
N	(38/15)	49 ± 2	94 ± 2	188 ± 6	91 ± 6	26 ± 1	<4,5
OB	(6/20)	45 ± 2	131 ± 12 *	184 ± 11	166 ± 15 *	47 ± 1 *	7-8
DT2	(8/19)	65 ± 2 *#	195 ± 14 *#	177 ± 10	144 ± 8 *	27 ± 2 #	12-15

Valores (media±EEM). N=53, OB=26 y DT2=27. *, $p<0,05$ vs N; #, $p<0,001$ vs OB.

Este estudio se ha llevado a cabo en piezas de músculo esquelético, y en miotúbulos en cultivo diferenciados de mioblastos, previamente aislados de músculo. Las muestras de músculo fueron obtenidas en el transcurso de intervenciones quirúrgicas (vascular, bariátrica, hernia inguinal o tiroidectomía), a la que el sujeto fue sometido por indicación médica ajena a este trabajo, y solo se incluyeron en el estudio las de los pacientes que no mostraban otra patología añadida. Las piezas de tejido, fueron obtenidas como muestras residuales de la propia cirugía, tras obtención del consentimiento informado y cumplimiento de los requisitos de La Declaración de Helsinki. Todos los sujetos procedían bien del Servicio de Cirugía Vascular de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, del de Cirugía general del Hospital Príncipe de

Asturias de Alcalá de Henares, o del Servicio de Cirugía del Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

2. MIOTÚBULOS HUMANOS

Los miotúbulos se establecieron por cultivo primario, a partir de mioblastos aislados y sometidos a crecimiento y diferenciación. Para ello, se desarrolló un protocolo, resultante de una combinación modificada de otros previamente descritos (Blau y Webster 1981; Henry, Ciaraldi y col. 1996).

2.1. Aislamiento de mioblastos

La muestra de músculo, inmediatamente después de su extracción, se sometió a tratamiento con tripsina y EDTA, para la extracción de sus células satélite –mioblastos con capacidad de proliferación–, que se encuentran, en muy bajo número, situadas entre la membrana basal y el retículo sarcoplasmático de las fibras del músculo adulto.

Reactivos

hEGF, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 Dexametasona, *Clonetics, Palo Alto, CA, EE.UU.*
 Albúmina bovina –BSA–, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 Suero fetal bovino –FBS–, *Lonza, Verviers, Bélgica.*
 Gentamicina, *BBraun, Barcelona, España.*
 Anfotericina B, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 Penicilina, *Lab. Normon, S.A., Madrid, España.*
 Estreptomycin, *Lab. Normon, S.A., Madrid, España.*
 Colágeno de cola de rata, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 Tripsina (2,5 %, p/v), *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 EDTA (2 %, p/v), *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*
 Ácido acético, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Medios

HAM'S F-10, *Biochrom KG, Berlín, Alemania.*
 DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*
 M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*
Disolución de tripsina/EDTA-a: tripsina 0,05 % y EDTA 0,02 %, en HAM'S.
Disolución de tripsina/EDTA-b: tripsina 0,025 % y EDTA 0,01 %, en HAM'S.

Crecimiento: DMEM/M-199 (3/1, v/v) con hEGF (10 ng/ml), dexametasona (0,39 µg/ml), BSA (0,5 mg/ml), gentamicina (50 µg/ml), anfotericina B (50 ng/ml), penicilina combinada con estreptomicina (50 UI/ml/50 µg/ml), FBS (10 %, v/v).

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), FBS (2 %, v/v) y antibiótico (penicilina/estreptomicina, 50UI/ml/50 µg/ml).

Disolución de colágeno: 2,5 mg de colágeno/25 ml ácido acético 0,1 M.

Material

Frascos estériles de 75 cm², *Costar Corporation, Cambridge, MA, EE.UU.*

Agitador, *Biomerioux*.

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Incubador de CO₂, *RSBiotech, South Newmoor, Escocia, Gran Bretaña*.

Procedimiento

La pieza de músculo (≈400 mg) recién obtenida, una vez limpia de sangre y tejido conectivo –por lavado con HAM'S F10–, fue sometida a disociación en condiciones estériles, mediante tres tratamientos sucesivos de 20 min con 25 ml de tripsina/EDTA-a, en un frasco estéril de 75 cm², a temperatura ambiente y con agitación energética. A las células, que con el fin de evitar la acción de las proteasas se recogen y mantienen a 4 °C tras cada tratamiento de disociación, se añadió FBS (10 %, v/v), y se sedimentaron a 900 g durante 4 min; tras ello, se resuspendieron en 5 ml de medio de crecimiento. Con el fin de eliminar de la preparación el número de fibroblastos, o reducir estos (Blau y Webster 1981), las células se sembraron en una placa estéril de 100 mm de diámetro, libre de colágeno, donde se mantuvieron durante 20 min a 37 °C; a continuación, se recogieron las no adheridas, y se inició su proliferación y cultivo en frascos de 75 cm², previamente tratados durante 5 h con 1 ml de una disolución de colágeno.

2.2. Cultivo y diferenciación

Las células se mantuvieron a 37 °C en medio de crecimiento (M&M, 2.1.), con cambios del mismo cada 3-4 días, en un incubador con atmósfera de O₂/CO₂ (95 %/5 %), hasta alcanzar, aproximadamente, el 80 % de confluencia, lo que sucede tras 4-6 semanas. Posteriormente, se llevó a cabo una tripsinización suave (tripsina/EDTA-b), con el fin de separar y recoger las células, las cuales, tras ello, y para proseguir con su diferenciación en miotúbulos, se cuantificaron y sembraron, tanto en la proporción de 20.000 células por pocillo de 35 mm de diámetro, como en la de 200.000 células por placa estéril de 100 mm de diámetro.

Las células sembradas se mantuvieron entre 10-15 días, hasta alcanzar el 70-80 % de confluencia; tras ello, el medio de crecimiento se sustituyó por el de diferenciación (M&M, 2.1.), con el fin de lograr la diferenciación de mioblastos a miotúbulos, lo que se estima en 3-4 días (**Fig. 5**). La eficacia de este proceso fue comprobada por comparación de la actividad creatina quinasa (Gerhardt 1983) entre células sin diferenciar y diferenciadas (Luque, González y col. 2002), la cual se duplica en el paso de mioblastos a miotúbulos.

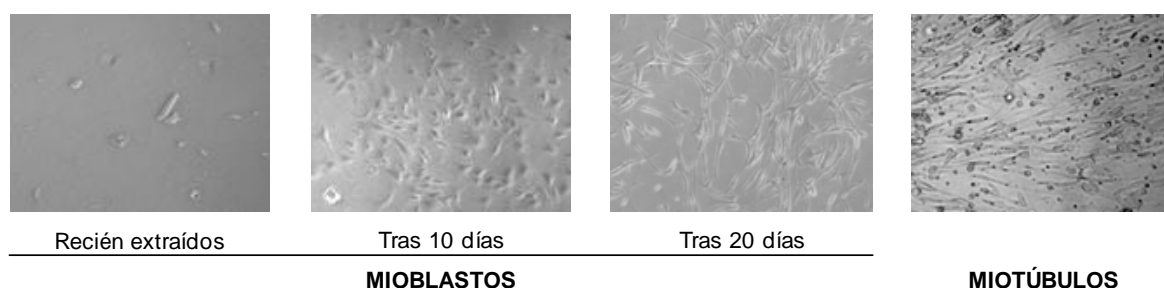


Figura 5. Miotúbulos humanos, diferenciados de mioblastos tras su extracción y crecimiento.

3. COMPUESTOS e INHIBIDORES

Para la realización de este estudio se han utilizado tres compuestos distintos: el BRS-3-AP, agonista sintético del receptor BRS-3; el compuesto ME, antagonista del receptor GRPR; y la insulina, que actuó como control positivo en cada uno de los experimentos. Además, se han empleado diferentes inhibidores como la citocalasina, inhibidor del transporte de glucosa no debido a los glucotransportadores; la wortmanina, inhibidor del sistema PI3K/PKB; el PD98059, inhibidor de las MAPKs; y la rapamicina, inhibidor de mTOR –diana de la rapamicina en células de mamífero–.

Compuestos

[D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin₆₋₁₄–BRS-3-AP–, *Bachem AG, Budendorf, Suiza*.

Insulina de cerdo, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca*.

[D-Phe⁶]bombesin₆₋₁₄ metil ester –ME–, donado por Dr. Robert T. Jensen, *NIDDK, NIH, Bethesda, MD, EE.UU.*

Inhibidores

Citocalasina B, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

PD98059, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Rapamicina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Wortmanina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

4. ARNm

El protocolo incluyó, por este orden, el aislamiento del ácido ribonucleico –ARN– total y su cuantificación, la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario –ADNc–, y la determinación, con cebadores específicos, de la cantidad relativa de ARNm de BRS-3 y de Glut-4.

4.1. Aislamiento de ARN del músculo esquelético

El aislamiento del ARN del músculo esquelético, se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial (RNeasy Fibrous Tissue KitTM).

Reactivo: RNeasy Fibrous Tissue KitTM, QIAGEN, Austin, Texas, EE.UU.

Material

Nanodrop ND-1000, Nucliber, Madrid, España.

Centrífuga BECKMAN GS-15R, Beckman Instruments Inc., Palo Alto CA, EE.UU.

Centrífuga Eppendorf 5424R, Haberbeck, Alemania.

Procedimiento

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar degradaciones por la presencia de ARNasas. Partiendo de 120 mg de tejido de músculo esquelético, se procedió según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Finalmente, una alícuota de 2 µl del ARN extraído, se utilizó para la valoración de la concentración en ARN, que se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El grado de pureza de la muestra se estimó por la relación de lecturas DO_{260}/DO_{280} , considerándose óptimo un resultado comprendido entre 1,7 y 2,0.

4.2. Aislamiento de ARN de mitotúbulos

El aislamiento de ARN de mitotúbulos se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial (TRI REAGENTTM), y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Reactivos

TRI REAGENTTM, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.

Cloroformo, Scharlau S.A., Barcelona, España.

Isopropanol, Scharlau S.A., Barcelona, España.

Etanol, E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Dietilpirocarbonato (DEPC), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Medios

Etanol 75 % en agua destilada.

Agua-DEPC: DEPC 0,1 % en agua destilada. El DEPC permaneció en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Material

Nanodrop ND-1000, *Nucliber, Madrid, España.*

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto CA, EE.UU.*

Centrífuga Eppendorf 5424R, *Haberbeck, Alemania.*

Procedimiento

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar degradaciones por la presencia de ARNasas. Las células (20.000/pocillo), tras serles retirado el medio de diferenciación, y lavadas dos veces con 2 ml DMEM/M-199 (3/1, v/v), se mantuvieron durante 60 min a 37 °C en dicho medio, en ausencia (control) y presencia del péptido de estudio, parando la reacción a 4 °C. Tras ello, a cada pocillo se añadió 150 µl de TRI REAGENT™ para su homogenización. A continuación, se recogió el material, que se distribuyó en fracciones de 900 µl, y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, y a cada fracción, se añadieron 180 µl de cloroformo, se mezcló con ayuda de un agitador tipo vórtex durante 15 seg, y se dejó reposar a temperatura ambiente entre 2-15 min. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 g, 4 °C durante 15 min, produciéndose el fraccionamiento de la mezcla en tres fases, de las cuales, se recogió la acuosa (superior), que contiene el ARN. Esta se pasó a otro tubo, al que se añadió 450 µl de isopropanol; tras mezclar suavemente, se dejó reposar durante 5-10 min a 4 °C, y se sometió a 12.000 g, a 4 °C durante 10 min. El sedimento (ARN), tras lavado con etanol al 75 % y centrifugación (7.500 g, 4 °C durante 5 min), se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el ARN obtenido se disolvió en 30 µl de agua-DEPC. Una alícuota de 2 µl se utilizó para la valoración de la concentración en ARN, que se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El grado de pureza de la muestra se estimó por la relación de lecturas DO_{260}/DO_{280} , considerándose óptimo un resultado comprendido entre 1,7 y 2,0.

4.3. Síntesis de ADNc

A partir del ARN extraído (3 µg para el receptor BRS-3 y 2 µg para el caso del Glut-4), se sintetizó una copia de ADNc por la acción de la enzima retrotranscriptasa. Para ello, se utilizó un kit comercial (High-Capacity cDNA Archive Kit), y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Reactivos: High-Capacity cDNA Archive Kit 810x RT Buffer, 25x dNTPs, 10x RP, Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa, *Applied Biosystems 94404 EE.UU.*

Medio RT: 2 µl de 10x RT Buffer, 0,8 µl de 25x dNTPs, 2 µl de 10x RP, 1 µl de Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa y 3,2 µl de agua-DEPC.

Material: termociclador, *PTC-100, MJ Research, Waltham, MA, EE.UU.*

Procedimiento

Se mezcló, suavemente, el ARN (M&M, 4.1. y 4.2.), disuelto en 20 µl de agua-DEPC, con 20 µl de medio RT, y se sometió a tres diferentes incubaciones (programa de 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 2 min a 95 °C). El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta continuar con el proceso de amplificación del gen a tiempo real.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Con esta técnica, los procesos de amplificación y detección del gen se producen de manera simultánea. Además, la fluorescencia emitida durante la amplificación indica la cantidad de ácido desoxirribonucleico –ADN– sintetizado en cada momento e, indirectamente, la de ARNm de la muestra.

SYBR® Premix Ex. Taq™ es un fluorocromo con capacidad de unión a las moléculas de ADN de doble cadena, independientemente su secuencia; al quedar intercalado, la fluorescencia del ADN aumenta significativamente, y durante las sucesivas etapas de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real –RCP-TR–, la intensidad de esta fluorescencia varía en función de la cantidad de ADN.

Reactivos

SYBR® Premix Ex. Taq™ (Perfect Real Time), *Applied Biosystems 94404 EE.UU.*

hBRS-3 (F: 5`GGCAGTTGTGAAGCCACTTGA y R: 5`AGACGCAGCCAGCTTTTACAC), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Glut-4 (F: 5`GCCTGCCAGAAAGAGTCTGAAG y R: 5`AGCACGACCGCAATGATCA), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

18S (F: 5' ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCCG y R: 5' ATTCCTAGCTGCGCTATCCAGG) ,
Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.

Material

Micro Amp™, placa óptica 48 pocillos, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

Micro Amp™, Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA Free, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

StepOne™, Real Time PCR System, *Applied Biosystems 94404, EE.UU.*

Procedimiento

La reacción de amplificación se realizó, en 4 µl para el caso del BRS-3 y en 2 µl para el del Glut-4 de ADNc (M&M, 4.3.), y en un volumen final de 25 µl, con los reactivos SYBR® Premix Ex. Taq™ siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Cada muestra fue analizada por triplicado, y el valor medio se utilizó para el cálculo de la expresión de ARNm. La cantidad de ARNm del gen de interés se normalizó con la de ARN ribosómico 18s, el cual fue utilizado como control endógeno.

5. SILENCIAMIENTO del GEN que CODIFICA el RECEPTOR BRS-3

El silenciamiento de la expresión del gen del BRS-3 en miotúbulos, se llevó a cabo mediante la utilización de tres parejas de ARN, *duplexes* de interferencia, según se describe a continuación. El análisis de ARNm se realizó mediante RCP-TR.

Reactivos

Lipofectamina™ RNAiMAX, *Invitrogen, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Duplexes siRNA: s2095, s2096, s2096, *Life Techonologies, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Medios

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Opti-MEM, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), FBS (2 %, v/v) y antibiótico (penicilina /estreptomicina, 50 UI/ml/50 µg/ml).

Procedimiento

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar degradaciones por la presencia de ARNasas. Las células (50-70 % de confluencia), tras serles retirado el medio de diferenciación, y lavadas dos veces con 2 ml Opti-MEM, se mantuvieron durante 4 h a 37 °C en dicho medio, en ausencia y presencia

de la mezcla de 5 pmoles de cada *duplexe* y 1,5 μ l de lipofectamina. Trascurrido ese tiempo, se retiró el medio y se volvieron a incubar a 37 °C durante 48 h con 2 ml del medio de diferenciación. Finalmente, la reacción se interrumpió a 4 °C, se extrajo y se analizó el ARNm tal y como queda especificado en los apartados 4.2., 4.3. y 4.4. de este capítulo.

6. PROTEÍNA

En cada muestra, se analizó el contenido en proteína, de membrana plasmática y del citoplasma, y de enzimas de señalización intracelular, por la técnica de Western blot.

6.1. Extracción de proteína del músculo esquelético

El análisis del contenido en proteína BRS-3 en músculo esquelético, se llevó a cabo, según se describe a continuación, por la técnica de Western blot.

Reactivos

Sacarosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Tris-HCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl₂, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

EGTA, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na₃VO₄, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na₄P₂O₇, E. Merck, Darmstadt, Alemania.

NaF, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Bacitracina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Leupeptina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Pepstatina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

PMSF, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Triton X-100, E. Merck, Darmstadt, Alemania.

Medios

PMSF 20 mM: PMSF 20 mM en 2-propanol.

De Homogenización (MH): sacarosa 250 mM, tris-base 20 mM, cloruro de magnesio 2,5 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, EGTA 1,2 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, bacitracina 30 U/ml, leupeptina 2 μ M, pepstatina 2 μ M, PMSF 2 mM, pH 7,4.

Material: centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Procedimiento

El músculo esquelético (\approx 120 mg) se homogenizó con vástago de teflón; a continuación, el tejido disgregado se sedimentó a 15.000 g durante 10 min a 4 °C; recuperando el sobrenadante de interés, el cual se transfirió a un tubo de 1,5 ml, y se conservó a -80 °C hasta su análisis (Arnold, Standaert y col. 1993). Una alícuota de 10 μ l fue utilizada para la determinación de su contenido en proteínas (Bradford 1976).

6.2. Extracción de proteína de membrana plasmática de miotúbulos

El análisis del contenido en proteína, BRS-3 y Glut-4, en membrana plasmática, preparadas según se muestra a continuación, se llevó a cabo por la técnica de Western blot.

Reactivo: Subcellular Protein Fractionation Kit, *Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.*

Material

Centrífuga Eppendorf 5424R, *Haberbeck, Alemania.*

Noria Selecta, *Barcelona, España.*

Procedimiento

Los miotúbulos (200.000/placa) se preincubaron durante 10 min a 37 °C en atmósfera de O₂/CO₂ (95 %/5 %), en 900 μ l de DMEM/M-199 (3/1, v/v), transcurrido este tiempo, se sometieron a 60 min de incubación, en ausencia (control) y presencia del péptido de estudio. A continuación, las membranas plasmáticas se extrajeron, utilizando para ello, y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, un kit comercial (Subcellular Protein Fractionation kit).

6.3. Extracción de proteína del citoplasma de miotúbulos

El análisis del contenido en proteína del citoplasma de miotúbulos, se realizó según se describe a continuación, mediante la técnica de Western blot.

Medios

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), (FBS 2 %, v/v) y antibiótico (penicilina /estreptomicina, 50 UI/ml/50 µg/ml).

PMSF 20 mM: PMSF 20 mM en 2-propanol.

Solubilización: sacarosa 250 mM, tris-base 20 mM, cloruro de magnesio 2,5 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, EGTA 1,2 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, bacitracina 30 U/ml, leupeptina 2 µM, pepstatina 2 µM, PMSF 2 mM, pH 7,4, con 1 % de triton X-100.

Material: centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Procedimiento

Los miotúbulos (20.000/pocillo) se preincubaron durante 10 min a 37 °C en atmósfera de O₂/CO₂ (95 %/5 %), en 900 µl de DMEM/M-199 (3/1, v/v). Transcurrido ese tiempo, se sometieron, para el estudio de la traslocación de la proteína Glut-4 a la membrana, a 60 min, y para el análisis de la fosforilación de las quinasas, a 3 min de incubación, en ausencia (control) y presencia del péptido de estudio; excepcionalmente, para investigar el efecto de la rapamicina –inhibidor de mTOR– sobre la actividad de la p70s6k, las células musculares de sujetos normales también se trataron con o sin el inhibidor. Finalmente, y de forma rápida, se eliminó el medio y se paró la reacción a 4 °C, añadiendo a cada pocillo 34 µl de medio de solubilización, y separando las células por raspado. Las células de pocillos de una misma condición se recogieron en un solo tubo de 1,5 ml, donde permanecieron 30 min a 4 °C, con agitación cada 10 min. Tras ello, la muestra se centrífugo a 15.000 g, 4 °C durante 5 min, y del sobrenadante, que contenía las proteínas citoplasmáticas, se tomó una alícuota de 15 µl para la determinación de concentración (Bradford 1976); el resto se almacenó a -80 °C hasta el estudio proteico, por Western blot.

6.4. Western Blot

El proceso incluye la separación de proteínas en gel de poliacrilamida, su transferencia a membrana de nitrocelulosa, y a la inmunodetección con anticuerpos específicos contra la proteína de estudio.

i) Separación de proteínas

Se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (Laemli 1970), en un sistema compuesto por una fuente de alimentación eléctrica, una cubeta vertical, cristales, separadores y peine.

Reactivos

Acrilamida, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Bisacrilamida, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

TEMED, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Persulfato de amonio, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Tris(hidroximetil) aminometano, TRIS, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Acido etilen-diaminotetraacético, EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Dodecil lauril sulfato, SDS, *Ferosa, Barcelona, España.*

Glicerol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Glicina, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Azul de bromofenol. *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Medios

Concentrante: tris 0,05 M, SDS al 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 6,7.

De desarrollo: tris 375 mM, SDS al 0,1 %, EDTA 2 mM, glicerol al 10 %, pH 8,9.

Tampón de muestra: tris 187,5 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol $2,5 \times 10^{-3}$ %, pH 8,9.

Tampón de electroforesis: tris 50 mM, glicina 375 mM, SDS 0,1 % y EDTA 2 mM.

Materiales

Cubeta, Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Fuente de alimentación eléctrica, Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Spacer plates (0,75 mm) Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Cristales con separadores de 0,75 mm, Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Procedimiento

Se diluyeron 25 µg de proteína (M&M, 6.1., 6.2. y 6.3.) en tampón de muestra (1/1), y la disolución se mantuvo a 95 °C durante 5 min para, posteriormente, ser cargada en el gel de electroforesis. Tras su aplicación, y durante los primeros 45 min, la electroforesis se desarrolló a 40 V, que correspondió al paso de la muestra a través

del gel de concentración (4 % de acrilamida en medio concentrante); a continuación, la intensidad fue aumentada a 120 V, y así se sostuvo durante 2 h, que es el tiempo necesario para que la muestra recorra el gel de desarrollo (8 % de acrilamida en medio de desarrollo). El proceso se interrumpió cuando el frente de azul de bromofenol, incluido como marcador de posición de la muestra, alcanzó el extremo opuesto del gel.

ii) Transferencia

El paso de las proteínas, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, a una membrana de nitrocelulosa –donde se procede a la inmunodetección de la proteína en estudio–, se realizó eléctricamente.

Medio de transferencia: tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol (20 %, v/v) y SDS 0,0375 %.

Material

Fuente de alimentación eléctrica, Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Sistema de transferencia, Trans-blot SD, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Membrana de nitrocelulosa, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Papel Whatman filtro Extra Thick Filter Paper, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Procedimiento

Primeramente, el gel de poliacrilamida procedente de la separación de proteínas (M&M, 6.4.i) se mantuvo durante 30 min en medio de transferencia; así como, la membrana de nitrocelulosa, y seis láminas de papel Whatman de igual tamaño que el gel. A continuación, sobre el electrodo positivo del sistema, se situaron tres de los papeles whatman, sobre estas, la membrana de nitrocelulosa, el gel, y, por último, los tres papeles whatman restantes. La transferencia se desarrolló a 10 V durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se sometió a inmunodetección y cuantificación de las proteínas a estudiar en cada caso.

iii) Inmunodetección

Este proceso se realizó siguiendo las indicaciones de los reactivos para Western blot, proporcionados por Amersham Ibérica.

Reactivos

Suero anti-BRS-3, *Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.*

Suero anti-Glut-4, *Cell Signaling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-Tubulina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Suero anti-Akt, fosforilada y total, *Cell Signaling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-p70s6K, fosforilado y total, *Cell Signaling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-p42/p44, fosforilado y total, *Cell Signaling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-p90 RSK-1, fosforilado, *Millipore, Temecula, CA, EE.UU.*

Suero anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Suero anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano picante, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Leche en polvo desnatada, *Central Lechera Asturiana, Corporación Alimentaria Peñasanta, S.A. Granda Siero. Pdo. de Asturias, España.*

Reactivos quimioluminiscentes, ECL Western Blotting Reagents, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Revelador y fijador fotográfico, Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

Albúmina bovina, BSA, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Tween 20, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*

Medios

T-TBS: tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH a 7,5.

T-TBS-LD: tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH a 7,5, 0,05 % Tween 20, 5 % leche desnatada.

Revelador: Lx24 al 20 %, en agua.

Fijador: AL4 al 20 %, en agua.

Material

Película fotográfica, Hyperifilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Scanner, hp scanjet 7400c, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para densitometrar, Software Image-Quant® 3,3 *Molecular Dynamics, EE.UU.*

Procedimiento

En primer lugar, la membrana de nitrocelulosa, con las proteínas transferidas (M&M, 6.4.ii.), se mantuvo en T-TBS-LD durante 1 h, a temperatura ambiente; tras tres lavados durante 45 min con T-TBS, la membrana se incubó, durante 2 h, con el anticuerpo primario específico (**Tabla 2**). A continuación, se realizaron tres bloqueos con T-TBS-LD durante 30 min, seguidos de tres lavados rápidos con T-TBS, y se procedió a su tratamiento con el anticuerpo secundario durante 1 h; tras tres lavados

durante 45 min T-TBS, se trató durante 1 min con los reactivos quimioluminiscentes y, finalmente, se procedió a su autorradiografía por exposición entre 5 y 60 min a una película fotográfica. Tras el revelado de la película, se cuantificó la densidad de las bandas, por densitometría de transmisión, que se expresó en unidades arbitrarias de densidad óptica.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el análisis del contenido en proteína BRS-3, Glut-4, Tubulina, Akt, p70s6k, p42/p44 y p90 RSK-1.

Proteína	Primario	Dilución	Secundario	Dilución
BRS-3	Suero anti-BRS-3 en T-TBS 5 % BSA	1:250	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:8.000
Glut-4	Suero anti-Glut-4 en T-TBS 5 % BSA	1:250	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:500
Tubulina	Suero anti-tubulina en T-TBS 5 % BSA	1:1.000	Suero anti-IgG de ratón en T-TBS 5 % BSA	1:500
Akt	Suero anti-Akt, fosforilada y total, en T-TBS 5 % BSA	1:1.000	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:500
p70s6K	Suero anti-p70s6K, fosforilada y total, en T-TBS 5 % BSA	1:1.000	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:500
p42/p44	Suero anti-p42/p44, fosforilada y total, en T-TBS 5 % BSA	1:1.000	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:500
p90 RSK-1	Suero anti-p90 RSK-1, fosforilada, en T-TBS 5 % BSA	1:5.000	Suero anti-IgG de conejo en T-TBS 5 % BSA	1:500

Además, para la normalización de los resultados de la proteína BRS-3, Glut-4 y p90 RSK-1, se midió, en paralelo, el contenido en tubulina por inmuodetección de los geles con un suero anti-tubulina; sin embargo, la medida de densidad correspondiente a cada proteína quinasa fosforilada, se normalizó con respecto a la total.

7. ACTIVIDAD PI3K

Se midió como formación de fosfatidilinositol 3-fosfato –PIP₃–, en muestras de 200.000 células diferenciadas a miotúbulos, tratadas durante 3 min sin (control) y con los péptidos de estudio, utilizando para ello, y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, un kit comercial (PIP₃ Mass ELISA Kit, *Echelon Biosciences Inc, Salt Lake City, EE.UU.*).

8. TRANSPORTE de GLUCOSA

Se midió como incorporación de 2-deoxi-D-[1,2-³H(N)] glucosa, en muestras de 20.000 células diferenciadas a miotúbulos, en el propio pocillo, y según un protocolo modificado de otros previamente descritos (Hidaka, Howard y col. 1981; Mayor, Maianu y col. 1992).

Reactivos

2-deoxi-D-[1, 2-³H(N)] glucosa, *Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Alemania*.

NaOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*.

Líquido de centelleo, Ultima gold, *PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

Medios

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña*.

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña*.

NaOH 1 N

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), FBS (2 %, v/v) y antibiótico (penicilina /estreptomicina, 50 UI/ml/50 µg/ml).

Incubación (BE): hepes 20 mM, NaCl 120 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 2,5 mM, NaH₂PO₄ y CH₃COCOONa 1mM, pH 7,4.

Material: contador β, Tri-Carb 2810 TR, *PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

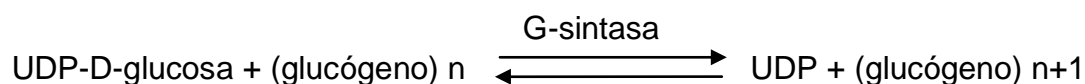
Procedimiento

Las células (20.000/pocillo), tras serles retirado el medio de diferenciación, y lavadas dos veces con 2 ml del de incubación, se mantuvieron durante 30 min a 37 °C en dicho medio, en ausencia (control) y presencia del péptido de estudio (BRS-3-AP: 10⁻⁷ M hasta 10⁻¹² M) y del ME, antagonista del receptor GRPR, a 10⁻⁶ M; además de wortmanina a 10⁻⁶ M, PD98059 a 2,5 x 10⁻⁵ M y rapamicina a 10⁻⁷ M –inhibidores de PI3K/PKB, MAPKs y p70s6k, respectivamente–. Tras ello, se añadieron 0,4 µCi (6,5 pmoles) de 2-deoxi-D-[1,2-³H(N)] glucosa (60 Ci/mmol), y se incubaron las células durante 5 min más. El contenido total de glucosa fue corregido con el valor del

transporte inespecífico, obtenido en tres muestras de células de cada experimento tratadas en paralelo con 3,23 mM de citocalasina B. La reacción se paró a 4 °C, y las células se lavaron dos veces con 2 ml de medio de incubación, con el fin de eliminar el exceso de glucosa radiactiva no incorporada. Una vez despegadas del pocillo, por raspado, las células, disueltas en 1 ml de NaOH 1 N, se añadieron a 3 ml de líquido de centelleo, para la estimación de su contenido en radiación β .

9. ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA *a*

Se utilizaron células sembradas en la proporción de 20.000 células por pocillo de 35 mm de diámetro, incubadas en ausencia (control) y presencia del péptido de estudio. La actividad glucógeno sintasa *a* se midió según el método ya descrito (Hue, Bontemps y col. 1975), en presencia de Na₂SO₄, –inhibidor de la forma inactiva, *b*, de la enzima–, y como formación de glucógeno a partir de UDP-¹⁴C-glucosa, según la reacción:



El procedimiento de extracción del glucógeno formado está basado en un método descrito (Fleig, Noether-Fleig y col. 1984), con algunas diferencias.

Reactivos

Glicilglicina, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Glucógeno, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

KOH, *E. merck, Darmstadt, Alemania.*

UDP-glucosa, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

UDP-¹⁴C-glucosa, *Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.*

Líquido de centelleo, *Ultima gold, PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

Medios

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

KOH 0,5 N.

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), FBS (2 %, v/v) y antibiótico (penicilina /estreptomicina, 50 UI/ml/50 µg/ml).

Homogeneización: FNa 100 mM, glucógeno (0,5 %, p/v), glicilglicina 50 mM y EDTA 35 mM, pH 7,4.

Incubación: UDP-glucosa 0,25 mM, glucógeno 1 %, glicilglicina 60 mM, Na₂SO₄ 10 mM, EDTA 4,7 mM y UDP-¹⁴C-glucosa 1,25 µCi/ml (1,5 µM).

Material

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Contador β Tri-Carb 2810 TR, *PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

Procedimiento

Las células (20.000/pocillo), ya diferenciadas en miotúbulos, se incubaron durante 30 min a 37 °C, en 900 µl de DMEM/M-199 (3/1, v/v); y otra posterior de 10 min a 37 °C, en ausencia o presencia del péptido de estudio; tras ello, se retiró el medio, y las células se conservaron a -80 °C hasta el momento de la determinación de sus actividades enzimáticas. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron entre 30-50 µl de medio de homogeneización a 4 °C, para ajustar la proporción de proteínas a 160 µg proteína/40 µl, para lo que estas fueron previamente medidas (Bradford 1976) en un par de muestras. Seguidamente, se recogió el homogeneizado, y se transfirió a un tubo de cristal en el que se terminó de disgregar por sonicación. A continuación, en un tubo de 10 ml de capacidad, que contenía 80 µl de medio de incubación, se añadieron 40 µl del homogeneizado celular, y la mezcla se incubó durante 15 min a 20 °C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de KOH 0,5 N para su disolución, 35 µl de glucógeno al 10,5 %, (final, 100 mg/ml) y 2 ml de etanol al 78 % (final, 66 %) a 4 °C; tras unos segundos de agitación, se mantuvo en reposo durante 15 min a 4 °C. Tras ello, la muestra se centrifugó a 150 g, 4 °C durante 5 min, se aspiró el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió de nuevo en 5 ml de etanol al 66 %, para su lavado; tras una nueva centrifugación a 1.740 g, 4 °C durante 30 min, se descartó el sobrenadante, y se añadieron 400 µl de agua para la disolución del glucógeno precipitado, que se transfirió a viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo, para la estimación de su contenido en ¹⁴C en un contador de radiación β.

10. SÍNTESIS de GLUCÓGENO

Se estudió como la incorporación de D-[U-¹⁴C]-glucosa en glucógeno, según un protocolo modificado de otro descrito (Fleig, Noether-Fleig y col. 1984).

Reactivos

Solución isotónica de cloruro sódico al 0,9 %, *BBraun Medical S.A., Barcelona, España.*

D-[U-¹⁴C]-glucosa, *Amersham Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra, Gran Bretaña.*

Glucógeno, *Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EE.UU.*

Líquido de centelleo, *Ultima gold, PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

NaOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Medios

DMEM 1x, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

M-199, *Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña.*

NAOH 0,5 N.

Diferenciación: DMEM/M-199 (3/1, v/v), FBS (2 %, v/v) y antibiótico (penicilina /estreptomicina, 50 UI/ml/50 µg/ml).

Material

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Contador β Tri-Carb 2810 TR, *PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.*

Procedimiento

Las células (20.000/pocillo), diferenciadas a miotúbulos, y libres del medio de diferenciación y ulterior lavado con 1 ml de DMEM/M-199 (3/1, v/v) se incubaron durante 60 min a 37 °C en atmósfera de O₂/CO₂ (95 %/5 %), 1 ml de DMEM/M-199 (3/1, v/v) con D-[U-¹⁴C]-glucosa (1,5 µCi), y en ausencia (control) o presencia del péptido de estudio. La reacción se interrumpió a 4 °C; el medio se desechó por aspiración, y las células se lavaron dos veces consecutivas con suero fisiológico, para la eliminación de cualquier resto de radiactividad. Tras ello, se añadió 1 ml de NAOH 0,5 N, y la mezcla se transfirió a un tubo de plástico de 10 ml, para ser sometida a 70 °C durante 5 min, con el fin de solubilizar sus proteínas. Tras tomar una alícuota de 10 µl para la determinación de su contenido proteínico (Bradford 1976), al resto se le añadió 100 µl de glucógeno al 10,5 % en H₂O (final, 100 µg/ml), como soporte del glucógeno formado. A continuación, se procedió a la extracción del glucógeno, precipitando este con 2 ml de etanol al 96 % (final, 85 %) a 4 °C y agitación. La mezcla se mantuvo durante 15 min a 4 °C, tras los cuales, el glucógeno precipitado fue sedimentado a 1.100 g, a 4 °C durante 10 min. Una vez descartado el sobrenadante por aspiración, el sedimento se lavó con 5 ml de etanol al 96 %. El nuevo sedimento, obtenido por centrifugación a 1.100 g durante 10 min a 4 °C, se disolvió en 600 µl de agua, y se transfirió a viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo, para la medida de su contenido en ¹⁴C en un contador de radiación β.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados se han expresado como media \pm el error estándar de la media –EEM–, junto con el número de observaciones –n–. La significación estadística ($p < 0,05$) de los incrementos fue valorada por el test de la t de Student.

RESULTADOS

1. NIVELES de ARNm y PROTEÍNA BRS-3, en MÚSCULO ESQUELÉTICO de SUJETOS NORMALES, PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

La disrupción del receptor BRS-3 es el origen de alteraciones de carácter metabólico. Este trabajo, se inicia con el análisis de la expresión del BRS-3, en el músculo de pacientes obesos y en el de diabéticos tipo 2, y su comparación con el de sujetos normales.

La **figura 6** muestra los niveles de transcripción –ARNm– y traducción –proteína– del BRS-3, en músculo procedente de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB), y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados, respecto al grupo normal, en cantidad relativa –ARNm–, o en porcentaje –proteína–.

En relación con el grupo normal (ARNm: $1,000 \pm 0,020$, $n=18$ y proteína: 100 ± 10 %, $n=4$), el nivel de ARNm del receptor BRS-3 en los pacientes obesos fue mucho menor ($0,130 \pm 0,004$ veces-N, $n=10$, $p < 0,001$), y también fue menor la cantidad de proteína de membrana plasmática (73 ± 4 % N, $n=5$, $p < 0,02$). Los pacientes diabéticos tipo 2 mostraron un valor reducido de ARNm del BRS-3 ($0,080 \pm 0,004$ veces-N, $n=9$, $p < 0,001$), que fue acompañado por también una menor cantidad de proteína (50 ± 6 % N, $n=5$, $p < 0,01$). Específicamente, en los pacientes diabéticos tipo 2, el valor de ARNm y el de proteína del receptor BRS-3, fue aún menor que el obtenido en los pacientes obesos ($p < 0,001$ y $p < 0,02$ vs OB, respectivamente).

2. EFECTO del BRS-3-AP sobre los NIVELES de ARNm y PROTEÍNA BRS-3, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

El péptido BRS-3-AP tiene una alta afinidad y potencia para activar el receptor BRS-3. Por ello, en este estudio, se ha investigado la implicación de este ligando sintético en la regulación de la expresión del receptor BRS-3 –ARNm y proteína–, en sujetos normales, en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2.

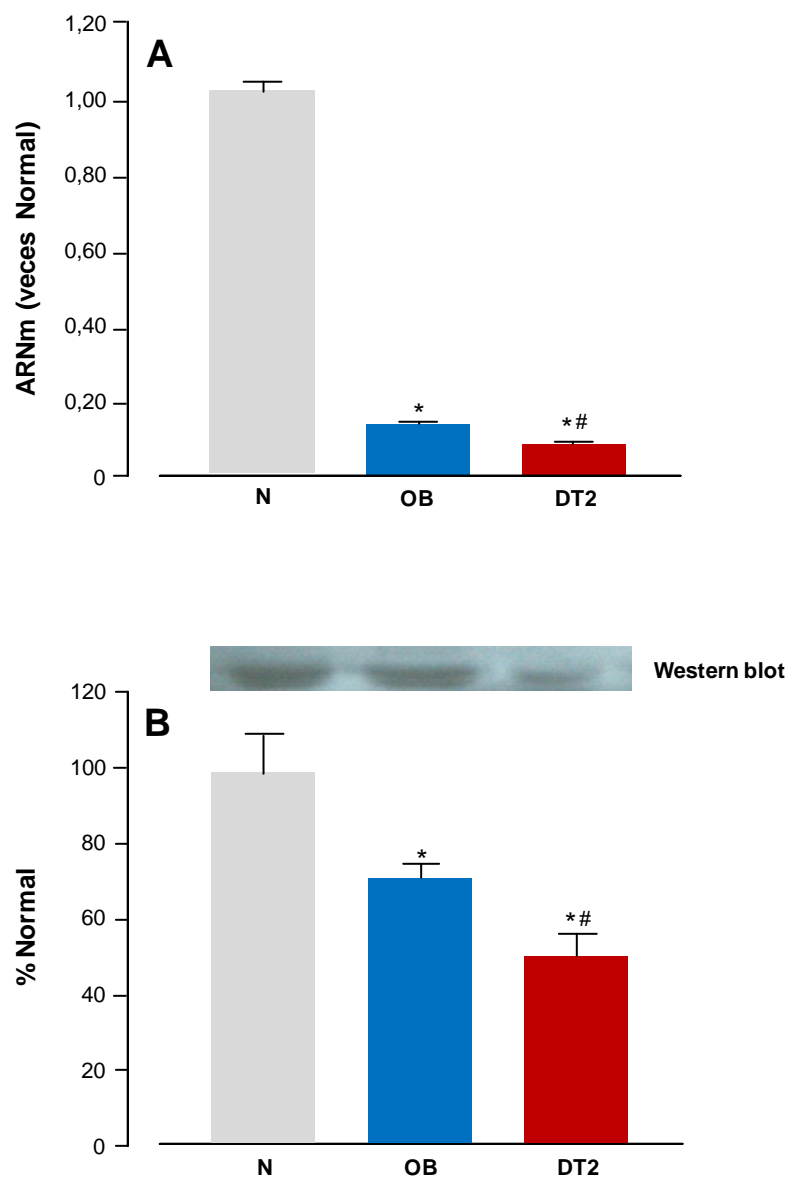


Figura 6. A) ARNm del receptor BRS-3, en piezas de músculo esquelético de 18 sujetos normales (N, ■), 10 pacientes obesos (OB, ■) y 9 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). **B)** proteína del receptor BRS-3, en piezas de músculo esquelético de 4 sujetos normales (N, ■), 5 pacientes obesos (OB, ■) y 5 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). Los resultados (media±EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o porcentaje (proteína) del valor medio control, obtenido en sujetos normales, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,02$ vs N; #, $p < 0,02$ vs OB.

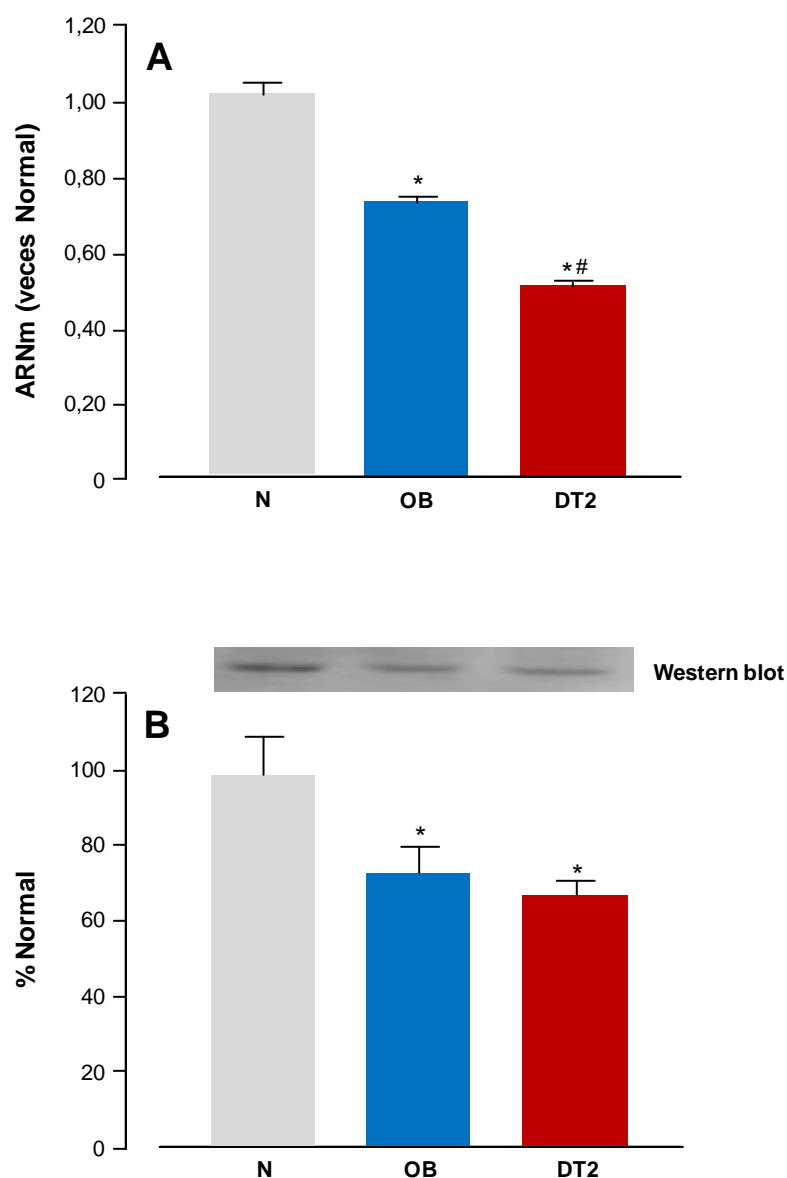


Figura 7. A) ARNm del receptor BRS-3, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N,), 3 pacientes obesos (OB,) y 3 diabéticos tipo 2 (DT2,). **B)** proteína del receptor BRS-3, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N,), 3 pacientes obesos (OB,) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2,). Los resultados (media \pm EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o porcentaje (proteína) del valor medio control, obtenido en sujetos normales, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs N; # $p < 0,001$ vs OB.

La **figura 7** contiene los niveles de transcripción –ARNm– y traducción –proteína– del BRS-3, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB), y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados, con relación al grupo normal, en cantidad relativa –ARNm–, o en porcentaje –proteína–.

Respecto al sujeto normal ($1,000 \pm 0,030$, $n=3$), se observó una reducción en el nivel de ARNm del receptor BRS-3 en los pacientes obesos ($0,737 \pm 0,021$ veces-N, $n=3$, $p<0,01$), que fue aún menor en los diabéticos tipo 2 ($0,518 \pm 0,013$ veces-N, $n=3$, $p<0,01$), siendo, a su vez, en estos últimos, menor ($p<0,001$) que en el grupo obeso. Esa diferencia en el nivel de ARNm con el grupo normal, vino acompañada de un valor disminuido en la cantidad de proteína BRS-3 de la membrana plasmática (OB: 74 ± 7 % N, $n=3$, $p<0,05$ y DT2: 67 ± 4 % N, $n=4$, $p<0,02$ vs N: 100 ± 10 , $n=3$).

La **figura 8** recoge el efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre los niveles de transcripción –ARNm– y traducción –proteína– del BRS-3, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados bien en cantidad relativa –ARNm–, o en porcentaje de incremento –proteína– del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

En sujetos normales, el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, estimuló significativamente el nivel de ARNm del receptor BRS-3, aumentando hasta alcanzar el máximo a 10^{-9} M, y manteniéndose estable a 10^{-8} M (10^{-10} M: $1,71 \pm 0,08$ veces-N-control; 10^{-9} M: $3,22 \pm 0,15$ veces-N-control; 10^{-8} M: $2,89 \pm 0,09$ veces-N-control, $n=3$, $p<0,01$). Este aumento en la expresión fue acompañado por un incremento en la cantidad de proteína BRS-3 de la membrana plasmática, que también fue máximo a 10^{-9} M, y que permaneció estable a 10^{-8} M del péptido (10^{-9} M: 71 ± 17 % Δ N-control; 10^{-8} M: 53 ± 9 % Δ N-control, $n=3$, $p<0,05$). En ambos parámetros, los resultados producidos por 10^{-9} M de BRS-3-AP fueron similares a los obtenidos con cantidades equimolares de insulina (ARNm: $2,87 \pm 0,07$ veces-N-control, $n=3$, $p<0,001$ y proteína: 33 ± 4 % Δ N-control, $n=3$, $p<0,05$).

En los pacientes obesos, el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, aumentó tanto el nivel de ARNm como el de proteína del receptor BRS-3 (ARNm: $1,31 \pm 0,04$ veces-OB-control, $n=3$, $p<0,01$ y proteína: 32 ± 5 % Δ OB-control; $n=3$, $p<0,05$), siendo este efecto de la misma magnitud que el inducido con insulina a 10^{-9} M (ARNm: $1,22 \pm 0,06$ veces-OB-control, $n=3$, $p<0,05$ y proteína: 40 ± 8 % Δ OB-control, $n=3$, $p<0,05$).

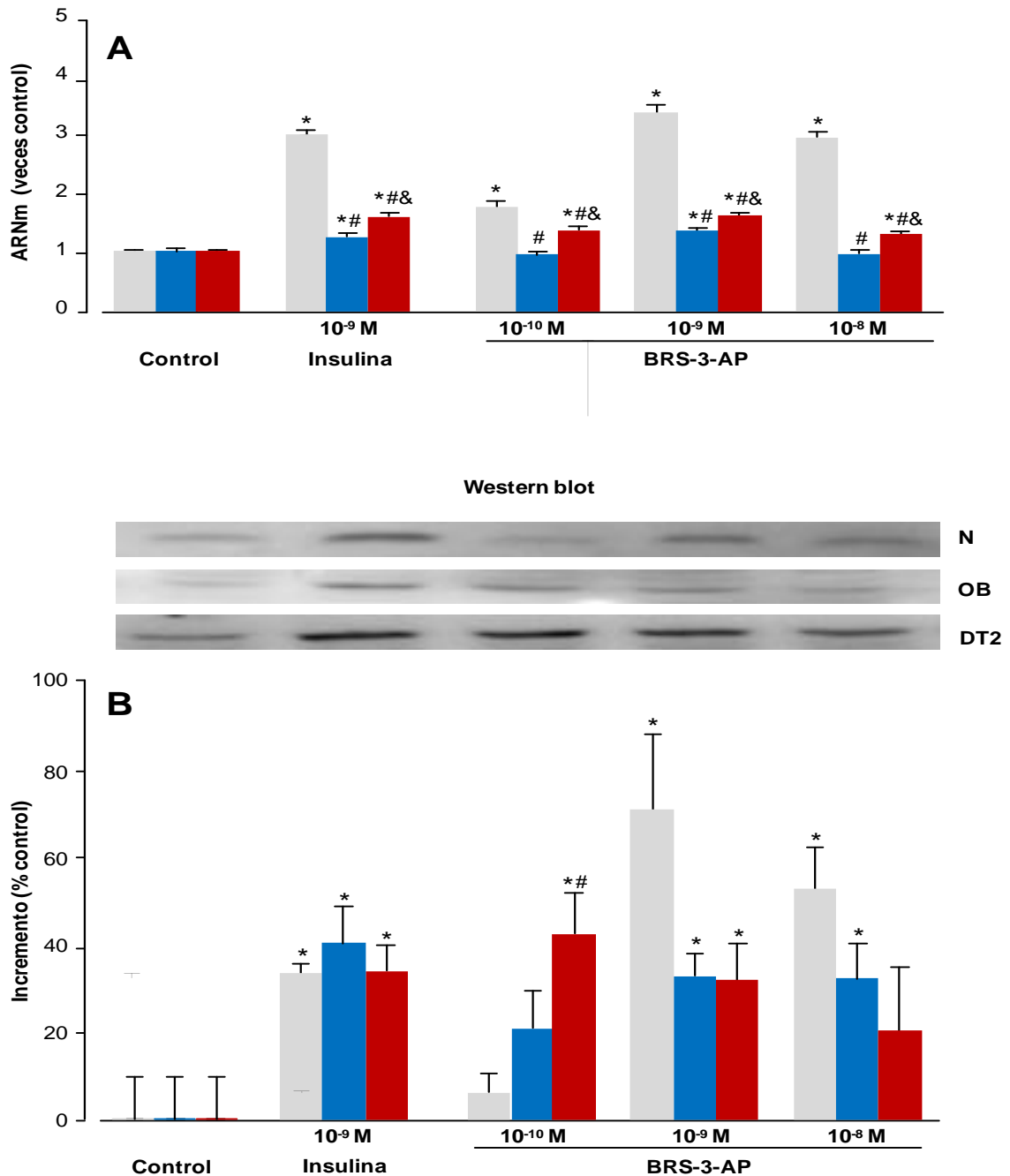


Figura 8. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre **A)** ARNm del receptor BRS-3, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N, ■), 3 pacientes obesos (OB, ■) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). **B)** proteína del receptor BRS-3, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N, ■), 3 pacientes obesos (OB, ■) y 5 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). Los resultados (media±EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o porcentaje de incremento (proteína) del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p<0,05$ vs propio grupo control; #, $p<0,05$ vs N; &, $p<0,02$ vs OB.

En el grupo diabético, el valor de ARNm del receptor BRS-3 aumentó a 10^{-10} M de BRS-3-AP, y fue máximo a 10^{-9} M (10^{-10} M: $1,32 \pm 0,04$ veces-DT2-control; 10^{-9} M: $1,56 \pm 0,04$ veces-DT2-control $n=4$, $p < 0,001$). El efecto en el nivel de proteína de BRS-3 de la membrana plasmática fue máximo a 10^{-10} M de BRS-3-AP, y se mantuvo a 10^{-9} M del péptido (10^{-10} M: 42 ± 9 % Δ DT2-control; 10^{-9} M: 32 ± 8 % Δ DT2-control, $n=5$, $p < 0,05$). Por otro lado, el incremento inducido por BRS-3-AP a 10^{-9} M, en ambos parámetros, fue equivalente al detectado con insulina a esa misma concentración (ARNm: $1,55 \pm 0,08$ veces-DT2-control, $n=4$, $p < 0,001$ y proteína: 33 ± 5 % Δ DT2-control, $n=5$, $p < 0,02$).

3. EFECTO del BRS-3-AP sobre la ACTIVIDAD de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

Varios mecanismos de metabolización en el músculo son dependientes de un incremento en la actividad quinasas. Por ello, en este trabajo se ha investigado el efecto del BRS-3-AP sobre la actividad de PI3K/PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1, en sujetos normales, en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2. Además, en todos los casos, la insulina fue utilizada como control positivo.

3.1. PI3K/PKB

Las **figuras 9 y 10** muestran el efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad PI3K, medida como formación de PIP_3 , y sobre la fosforilación de la PKB, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje del valor control –PI3K–, y en porcentaje de la fracción fosforilada respecto a la total –PKB–, obtenido en células del propio individuo, incubadas en ausencia de péptido (control).

PI3K

En los sujetos normales ($n=5$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, produjo un aumento en la formación de PIP_3 (**Fig. 9**), que fue máximo a 10^{-8} M del ligando (54 ± 11 % Δ N-control, $p < 0,01$). El incremento producido por BRS-3-AP a 10^{-8} M fue similar al observado con insulina (10^{-9} M: 62 ± 12 % Δ N-control, $p < 0,01$).

En los pacientes obesos ($n=5$), el BRS-3-AP indujo un aumento en la actividad PI3K, que alcanzó el valor máximo a 10^{-9} M del péptido (27 ± 2 % Δ OB-control, $p < 0,01$), y se mantuvo a 10^{-8} M (**Fig. 9**). La insulina, en este grupo de pacientes, también estimuló la formación de PIP_3 (43 ± 9 % Δ OB-control, $p < 0,01$).

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=5$), el BRS-3-AP, ya desde 10^{-10} M, incrementó la formación de PIP_3 (24 ± 6 % Δ DT2-control, $p < 0,01$), y ese valor permaneció estable a 10^{-9} M del péptido (**Fig. 9**). La magnitud del estímulo a 10^{-10} M de BRS-3-AP fue similar a la obtenida con 10^{-9} M de insulina (36 ± 3 % Δ DT2-control, $p < 0,01$).

PKB

En los sujetos normales ($n=9$), el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, aumentó el grado de fosforilación de la PKB, que alcanzó el máximo a 10^{-8} M ($p < 0,001$). El efecto inducido por BRS-3-AP a 10^{-8} M fue similar al obtenido con insulina a 10^{-9} M (**Fig. 10**).

En los pacientes obesos ($n=6$), el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, produjo un aumento máximo en la fosforilación de la enzima, y este valor se mantuvo a 10^{-8} M del péptido ($p < 0,01$). La estimulación producida a 10^{-9} M de BRS-3-AP fue equivalente a la inducida por cantidades equimolares de insulina (**Fig. 10**).

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=4$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, incrementó ($p < 0,05$) el grado de fosforilación de la PKB, que no se vio modificado a 10^{-9} M de BRS-3-AP ($p < 0,01$); sin embargo, el efecto se redujo drásticamente a 10^{-8} M del ligando sintético. La estimulación de la enzima, a 10^{-10} M de BRS-3-AP, fue semejante a la obtenida con insulina a 10^{-9} M (**Fig. 10**).

3.2. p70s6K

La **figura 11** contiene el efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de la p70s6K, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje del valor medio de la fracción fosforilada (p-p70s6K) respecto a la total, obtenido en células del propio individuo, incubadas en ausencia de péptido (control).

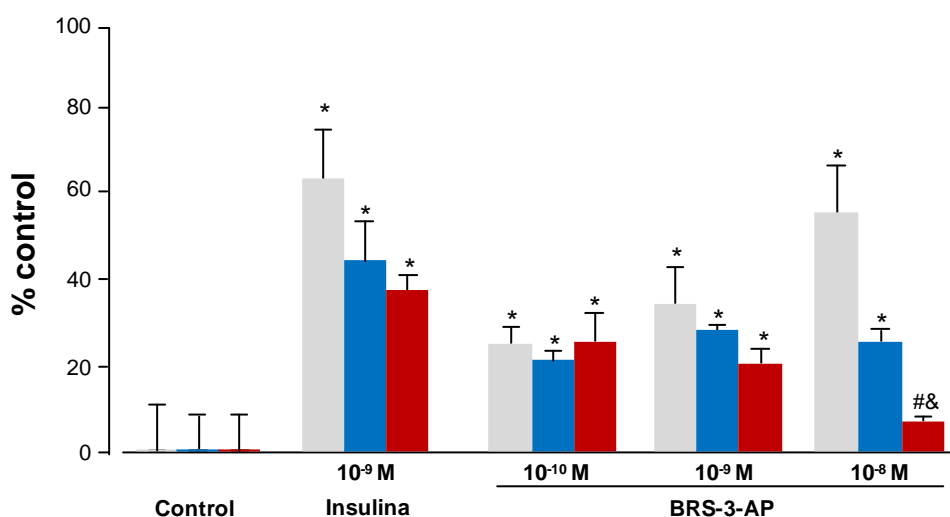
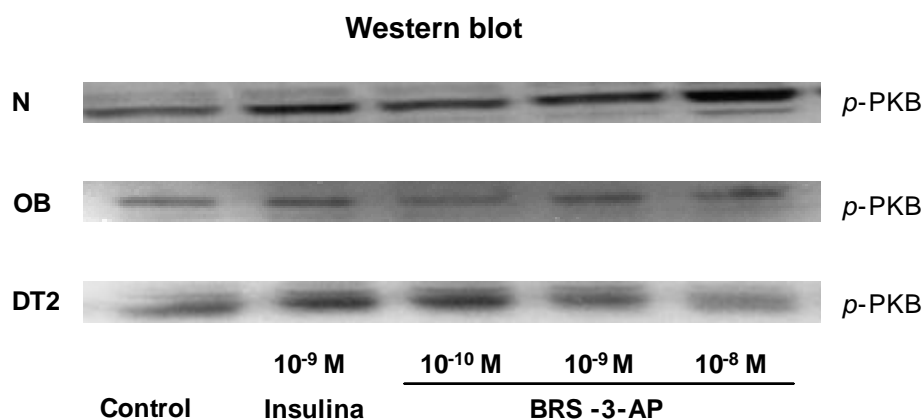
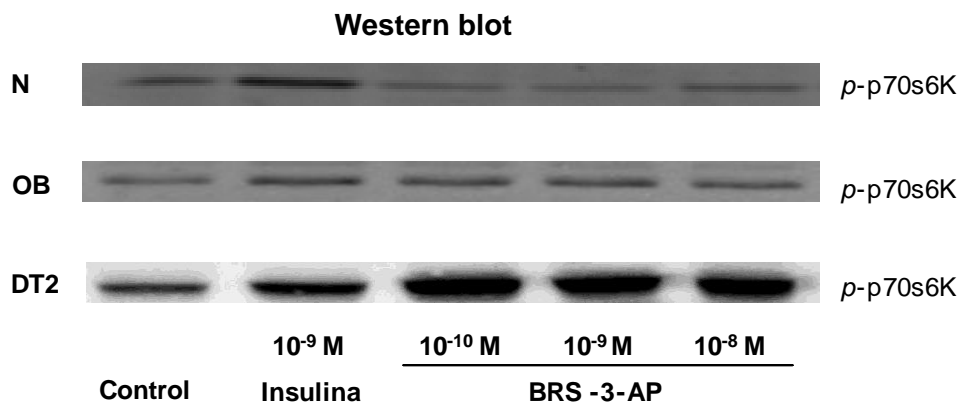


Figura 9. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad PI3K medida como formación de PIP_3 , en miotúbulos de 5 sujetos normales (N, ■), 5 pacientes obesos (OB, ■) y 5 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). Los resultados (media \pm EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,01$ vs N; &, $p < 0,001$ vs OB.



	Control	Insulina	BRS-3-AP		
		10^{-9} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M
N	100 ± 10	160 ± 7 *	117 ± 21	144 ± 12 *	178 ± 8 *
OB	100 ± 10	172 ± 13 *	126 ± 12	153 ± 12 *	139 ± 4 *#
DT2	100 ± 10	153 ± 10 *	160 ± 19 *	159 ± 8 *	100 ± 5 #&

Figura 10. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad PKB, en miotúbulos de 9 sujetos normales (N), 6 pacientes obesos (OB) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,01$ vs N; &, $p < 0,001$ vs OB.



	Control	Insulina	BRS-3-AP		
		10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M
N	100 ± 10	182 ± 17 *	100 ± 1	123 ± 10	158 ± 13 *
OB	100 ± 10	146 ± 6 *	146 ± 11 *#	151 ± 9 *	128 ± 7 *
DT2	100 ± 10	130 ± 6 *#	167 ± 10 *#	159 ± 13 *#	142 ± 10 *

Figura 11. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad p70s6K, en miotúbulos de 7 sujetos normales (N), 7 pacientes obesos (OB) y 7 diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,05$ vs N.

En los sujetos normales ($n=7$), el BRS-3-AP, a 10^{-8} M, indujo un incremento ($p<0,001$) en el grado de fosforilación de la p70s6k, de magnitud similar al obtenido con insulina a 10^{-9} M.

En los pacientes obesos ($n=7$), ya se detectó un aumento ($p<0,01$) en el nivel de fosforilación de la p70s6K, a 10^{-10} M de BRS-3-AP, que fue máximo a 10^{-9} M. El incremento sobre la actividad de la enzima a 10^{-10} M del péptido, en este grupo, fue mayor ($p<0,001$) que el observado en el grupo normal a la misma concentración, pero similar al obtenido con insulina a 10^{-9} M.

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=7$), el BRS-3-AP, a 10^{-11} M, estimuló la fosforilación de la p70s6K ($37\pm9\ \% \Delta$ DT2-control, $n=7$, $p<0,02$), alcanzó el máximo a 10^{-10} M, y ese aumento se mantuvo estable hasta 10^{-8} M del péptido ($p<0,01$). El efecto a 10^{-10} M del péptido fue superior ($p<0,05$) tanto al observado, a esa misma concentración de BRS-3-AP, en los sujetos normales, como al inducido por insulina a 10^{-9} M ($p<0,02$), en el grupo DT2.

3.3. MAPKs

La **figura 12** contiene el efecto del BRS-3-AP ($10^{-10} - 10^{-8}$ M), e insulina a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de las p42/p44 MAPKs, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje del valor medio de la fracción fosforilada (p-p42 y p-p44) respecto a la total, obtenido en células del propio individuo, incubadas en ausencia de péptido (control).

En los sujetos normales ($n=9$), la actividad, tanto de la p42 como de la p44 MAPK, alcanzó el máximo ($p<0,001$) a 10^{-8} M de BRS-3-AP. La magnitud del incremento producido en la actividad de la p44 MAPK, a 10^{-8} M del péptido, fue superior ($p<0,01$), a la obtenida con insulina a 10^{-9} M, mientras en el caso de la p42 MAPK, resultó ser similar.

En los pacientes obesos ($n=7$), el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, produjo un aumento ($p<0,02$) en el nivel de fosforilación de ambas isoformas de las MAPKs, y ese valor, máximo, se mantuvo a 10^{-8} M de péptido. El efecto estimulador del BRS-3-AP, 10^{-9} M, fue el mismo al obtenido con insulina a esa misma concentración. Sin embargo, el

incremento producido por el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, sobre la p-p42 MAPK superó ($p<0,05$) al valor obtenido en los sujetos normales.

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=7$), el BRS-3-AP ya desde 10^{-11} M, incrementó la actividad de ambas isoformas (p-p42: 30 ± 9 % Δ DT2-control, $n=7$, $p<0,05$ y p-p44: 33 ± 4 % Δ DT2-control, $n=7$, $p<0,01$), que alcanzó el máximo a 10^{-10} M, y descendió, drásticamente, a concentraciones crecientes del péptido. La magnitud del efecto producido, en este grupo, por BRS-3-AP a 10^{-10} M, fue equivalente a la observada con insulina a 10^{-9} M, pero superior ($p<0,001$) a la obtenida, tanto en el grupo normal como en el obeso, a esa misma concentración del péptido.

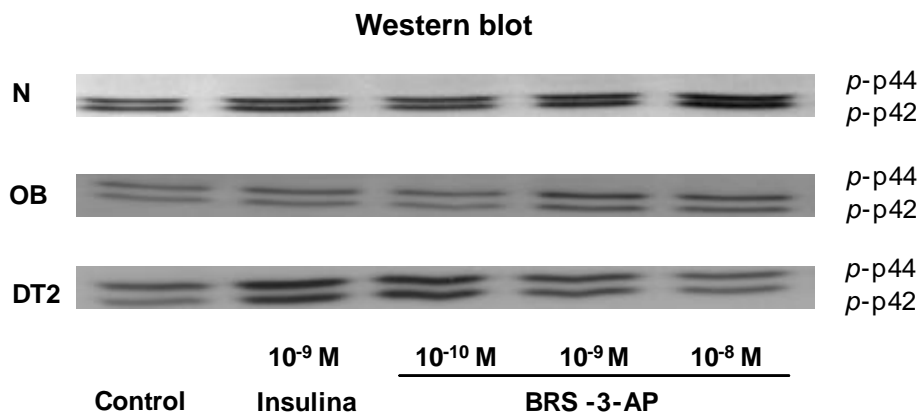
3.4. p90 RSK-1

La **figura 13** recoge la estimulación en la actividad de la p90 RSK-1, producida por BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje del valor medio de la fracción fosforilada (p-p90 RSK-1) respecto a la tubulina, obtenido en células del propio individuo, incubadas en ausencia de péptido (control).

En sujetos normales ($n=9$), el BRS-3-AP, a 10^{-8} M, aumentó ($p<0,01$) el grado de fosforilación de la p90 RSK-1, en magnitud similar a la obtenida con insulina a 10^{-9} M.

En pacientes obesos ($n=7$), se detectó, ya desde a 10^{-10} M de BRS-3-AP, un aumento ($p<0,02$) en la fracción fosforilada de la p90 RSK-1, cuyo valor fue máximo a 10^{-9} M del péptido ($p<0,001$). El incremento en la actividad de la enzima producida por BRS-3-AP, a 10^{-9} M, fue equivalente al inducido por insulina, a la misma concentración.

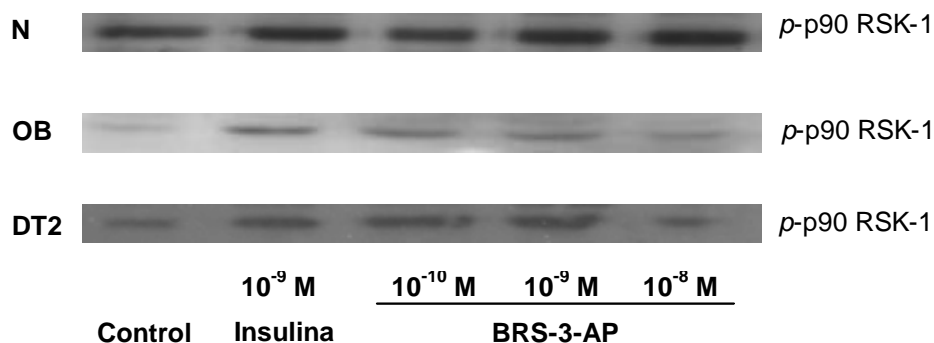
En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=6$), el BRS-3-AP, a 10^{-11} M, aumentó el grado de fosforilación de la p90 RSK-1 (26 ± 4 % Δ DT2-control, $n=6$, $p<0,05$), que alcanzó el valor máximo a 10^{-10} M del péptido ($p<0,001$). El efecto estimulador del BRS-3-AP, a 10^{-10} M, fue mayor al inducido, a la misma concentración del péptido, tanto en el sujeto normal como en el obeso ($p<0,01$), y también al obtenido ($p<0,001$) con insulina a 10^{-9} , en el grupo diabético tipo 2.



		Control	Insulina	BRS-3-AP		
			10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M
p-p44 MAPK	N	100 ± 10	129 ± 5 *	100 ± 13	137 ± 15 *	176 ± 14 *
	OB	100 ± 10	136 ± 8 *	113 ± 8	166 ± 24 *	152 ± 18 *
	DT2	100 ± 10	143 ± 21	194 ± 29 *#&	120 ± 8	111 ± 12 #
p-p42 MAPK	N	100 ± 10	142 ± 6 *	101 ± 7	116 ± 7	173 ± 15 *
	OB	100 ± 10	141 ± 6 *	121 ± 7 #	197 ± 26 *#	165 ± 19 *
	DT2	100 ± 10	160 ± 9 *	185 ± 17 *#&	135 ± 12 *	124 ± 8 #

Figura 12. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad p42/44 MAPKs, en miotúbulos de 9 sujetos normales (N), 7 pacientes obesos (OB) y 7 diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,05$ vs N; &, $p < 0,001$ vs OB.

Western blot



	Control	Insulina 10^{-9} M	10^{-10} M	BRS-3-AP 10^{-9} M	10^{-8} M
N	100 ± 10	155 ± 11 *	102 ± 7	141 ± 10 *	154 ± 14 *
OB	100 ± 10	142 ± 7 *	130 ± 4 *#	156 ± 6 *	127 ± 4 *
DT2	100 ± 10	125 ± 3 *#	146 ± 3 *#&	139 ± 6 *	111 ± 8 #

Figura 13. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre la actividad p90 RSK-1, en miotúbulos de 9 sujetos normales (N), 7 pacientes obesos (OB) y 6 diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, y mostrados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,05$ vs N; &, $p < 0,01$ vs OB.

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en la actividad control de esta enzima entre los miotúbulos de los tres grupos –N, OB y DT2–, analizadas en paralelo.

4. EFECTO del BRS-3-AP sobre los NIVELES de ARNm y PROTEÍNA GLUT-4, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

El transporte de glucosa dependiente de insulina, a través de la membrana celular, requiere de proteínas específicas –glucotransportadores–, y concretamente en el tejido muscular, del Glut-4. Debido a su relevancia, en este estudio se ha explorado la implicación del receptor BRS-3 y su ligando sintético en relación a la expresión del Glut-4 –ARNm y proteína–, en sujetos normales, en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2.

La **figura 14** muestra los valores de transcripción –ARNm– y traducción –proteína– del Glut-4, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB), y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados, respecto al grupo normal, en cantidad relativa –ARNm–, o porcentaje –proteína–.

En relación con el Glut-4, no se detectaron diferencias, en ninguno de los tres grupos de estudio, entre el nivel de ARNm del Glut-4 (media global de los tres grupos: $1,04 \pm 0,07$ veces-N, $n=10$), ni tampoco en la cantidad de proteína Glut-4 citoplasmática, tanto en las células sin tratar (media global de los tres grupos: 92 ± 6 % N, $n=8$) como en las incubadas con BRS-3-AP a 10^{-10} – 10^{-8} M (media global N: 90 ± 7 % Δ N-control, $n=3$; media global OB: 100 ± 3 % Δ OB-control, $n=4$ y media global DT2: 94 ± 8 % Δ DT2-control, $n=4$). Sin embargo, el análisis de la proteína Glut-4 de la membrana plasmática en el grupo obesos y en el diabético, proporcionó valores significativamente más bajos de lo normal (OB: 83 ± 4 % N, $n=3$, $p<0,05$ y DT2: 70 ± 5 % N, $n=4$, $p<0,05$ vs N: 100 ± 10 %, $n=3$).

La **figura 15** representa el efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M empleada como control positivo, sobre los niveles de transcripción –ARNm– y traducción –proteína– del Glut-4, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en cantidad relativa –ARNm–, o en porcentaje de incremento –proteína–

del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

En los sujetos normales, el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, estimuló el nivel de ARNm del Glut-4, hasta alcanzar un máximo a 10^{-8} M del péptido ($7,05 \pm 0,18$ veces-N-control, $n=7$, $p<0,001$). Este ligando sintético del BRS-3, tanto a 10^{-9} como 10^{-8} M, produjo un incremento en la cantidad de proteína Glut-4 de la membrana (10^{-9} M: 97 ± 5 % Δ N-control; 10^{-8} M: 85 ± 9 % Δ N-control, $n=4$, $p<0,001$). El efecto del BRS-3-AP, a 10^{-8} M, sobre la expresión del Glut-4 –ARNm y proteína–, fue mayor ($p<0,01$) que el obtenido con insulina a 10^{-9} M (ARNm: $1,94 \pm 0,05$ veces-N-control, $n=7$, $p<0,001$ y proteína: 37 ± 5 % Δ N-control, $n=4$, $p<0,001$).

En los pacientes obesos, el BRS-3-AP produjo un estímulo significativo en el valor del ARNm del Glut-4, ya a 10^{-10} M, permaneciendo estable a concentraciones crecientes de péptido (10^{-10} M: $2,03 \pm 0,07$ veces-OB-control; 10^{-9} M: $1,91 \pm 0,04$ veces-OB-control; 10^{-8} M: $1,87 \pm 0,07$ veces-OB-control, $n=5$, $p<0,001$). El nivel de proteína Glut-4 de la membrana plasmática, aumentó a 10^{-9} M del péptido (10^{-9} M: 82 ± 9 % Δ OB-control, $n=3$, $p<0,01$). La magnitud del efecto del BRS-3-AP, a 10^{-9} M, sobre la proteína Glut-4 de la membrana, fue superior ($p<0,02$) a la inducida con cantidades equimolares de insulina (ARNm: $2,94 \pm 0,09$ veces-OB-control, $n=5$, $p<0,001$ y proteína: 45 ± 6 % Δ OB-control, $n=3$, $p<0,02$).

En los pacientes diabéticos tipo 2, el nivel de ARNm del Glut-4 alcanzó un valor máximo a 10^{-10} M de BRS-3-AP, que permaneció constante hasta 10^{-8} M (10^{-10} M: $2,43 \pm 0,03$ veces-DT2-control; 10^{-9} M: $2,16 \pm 0,10$ veces-DT2-control; 10^{-8} M: $2,45 \pm 0,04$ veces-DT2-control, $n=6$, $p<0,001$). El nivel de proteína Glut-4 de la membrana plasmática, aumentó a 10^{-10} M y se mantuvo a 10^{-9} M (10^{-10} M: 36 ± 6 % Δ DT2-control; 10^{-9} M: 43 ± 7 % Δ DT2-control, $n=6$, $p<0,01$). El incremento obtenido con BRS-3-AP, a 10^{-9} M, sobre el nivel de ARNm del Glut-4, fue inferior ($p<0,001$) al inducido por insulina, a 10^{-9} M; sin embargo, la magnitud de su efecto sobre la cantidad de proteína Glut-4, fue semejante a la detectada con la hormona (Insulina 10^{-9} M; ARNm: $3,72 \pm 0,02$ veces-DT2-control, $n=6$, $p<0,001$ y proteína: 50 ± 7 % Δ DT2-control, $n=6$, $p<0,001$).

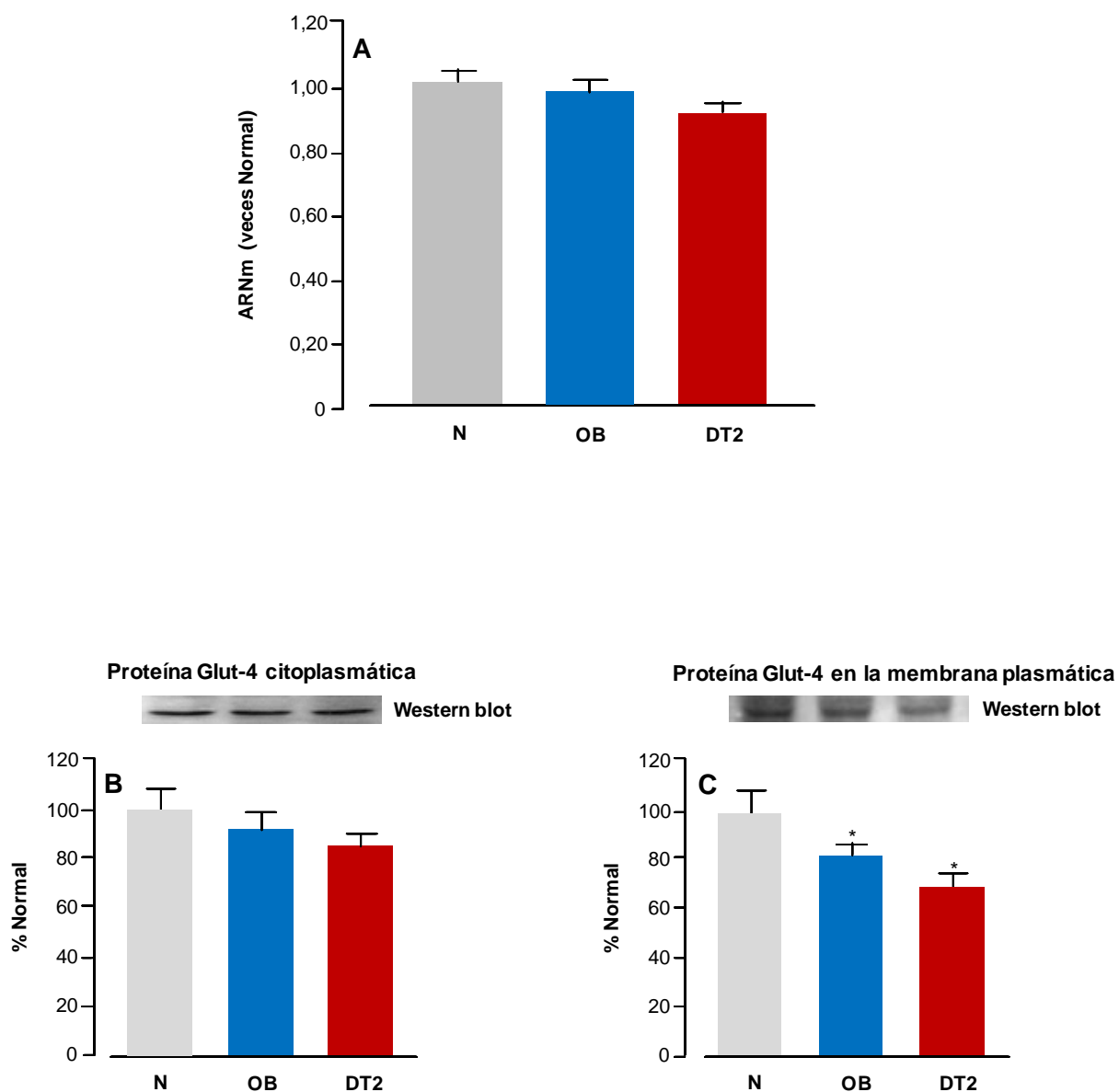


Figura 14. A) ARNm del Glut-4, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N, ■), 3 pacientes obesos (OB, ■) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). **B)** proteína Glut-4 citoplasmática, en miotúbulos de 2 sujetos normales (N, ■), 3 pacientes obesos (OB, ■) y 3 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). **C)** Proteína Glut-4 en la membrana plasmática, en miotúbulos de 3 sujetos normales (N, ■), 3 pacientes obesos (OB, ■) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2, ■). Los resultados (media±EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o porcentaje (proteína) del valor medio de su propio grupo, y representados junto a un Western blot representativo. *, $p < 0,05$ vs N.

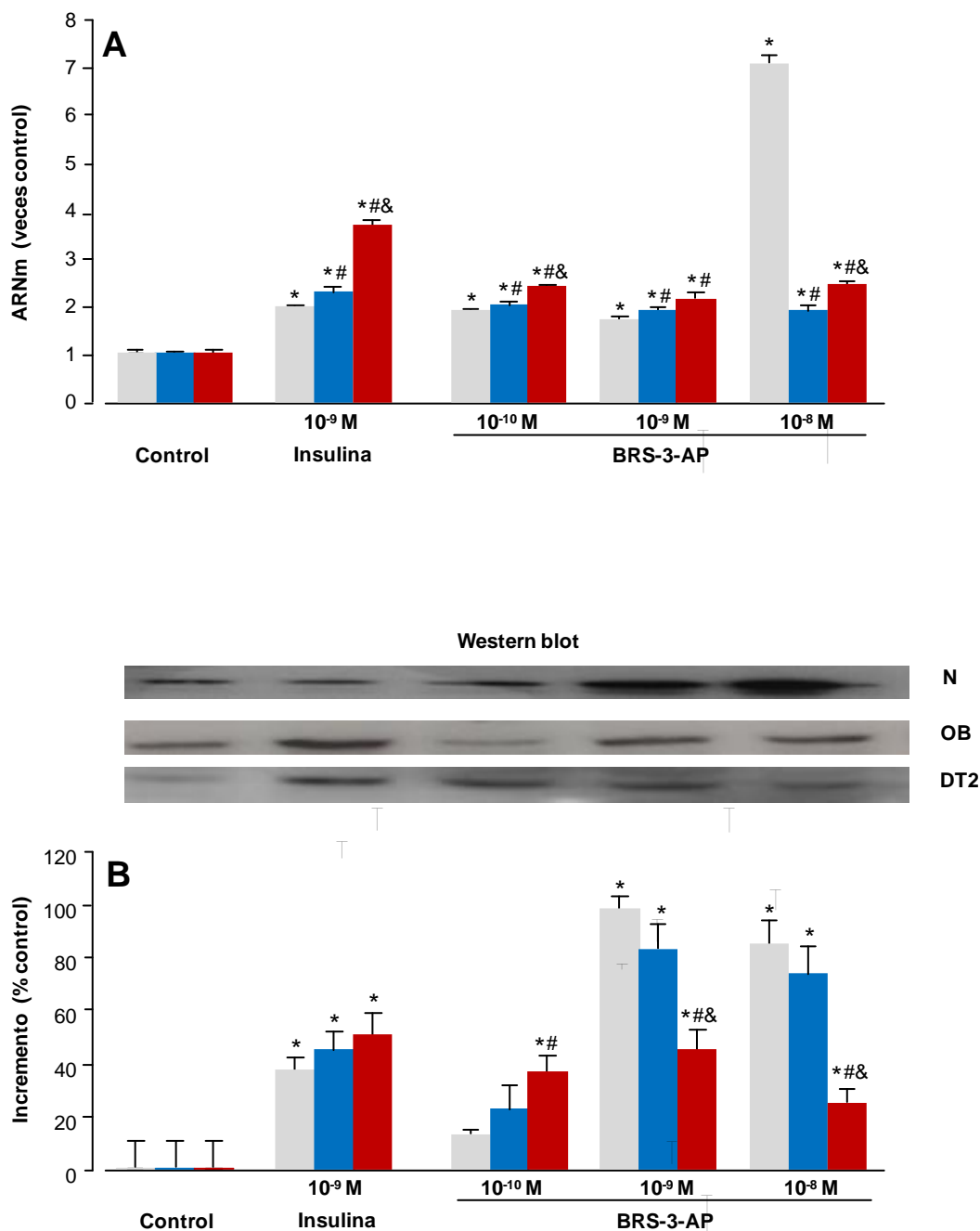








Figura 15. Efecto del BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M), e insulina a 10^{-9} M, sobre **A)** ARNm del Glut-4, en miotubulos de 7 sujetos normales (N, ) , 5 pacientes obesos (OB, ) y 6 diabéticos tipo 2 (DT2, ) . **B)** proteína Glut-4, en la membrana plasmática de miotubulos de 4 sujetos normales (N, ) , 3 pacientes obesos (OB, ) y 6 diabéticos tipo 2 (DT2, ) . Los resultados (media \pm EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o porcentaje de incremento (proteína) del valor medio de su propio grupo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido (control) y representados junto a un Western blot representativo. *, $p<0,05$ vs propio grupo control; #, $p<0,05$ vs N; &, $p<0,02$ vs OB.

5. EFECTO del BRS-3-AP sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

El transporte de glucosa, desde el medio extracelular al citoplasma, es un proceso esencial para el metabolismo energético. Debido a su importancia, se ha investigado la acción del BRS-3-AP sobre la captación del azúcar, en sujetos normales, en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2.

La **figura 16** muestra el efecto del BRS-3-AP (10^{-12} – 10^{-7} M), e insulina a 10^{-8} M, utilizada como control positivo, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

El transporte de glucosa inicial, en células procedentes de pacientes obesos ($9,8 \pm 1,7$ fmoles de glucosa/20.000 células) y de diabéticos tipo 2 ($8,3 \pm 0,8$ fmoles de glucosa/20.000 células), fue en ambos casos menor ($p < 0,05$) que el de sujetos normales ($23,1 \pm 7,0$ fmoles de glucosa/20.000 células).

En el grupo normal ($n=12$), el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, incrementó la captación del azúcar ($36,7 \pm 1,9$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,05$), alcanzando su máximo a 10^{-8} M ($42,9 \pm 2,9$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,02$), el cual se mantuvo a 10^{-7} M del péptido ($45,2 \pm 7,4$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,05$). La magnitud del efecto del BRS-3-AP a 10^{-8} M fue similar a la obtenida con insulina (10^{-8} M: $41,7 \pm 3,2$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,05$).

En el grupo obeso ($n=8$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, aumentó el transporte de glucosa ($15,9 \pm 0,9$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,01$), alcanzó un máximo a 10^{-9} M ($22,2 \pm 1,4$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,001$), y ese valor permaneció estable a mayores concentraciones del péptido (10^{-8} M: $19,4 \pm 2,4$ fmoles de glucosa/20.000 células; 10^{-7} M: $19,7 \pm 3,1$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,001$). El efecto estimulador del BRS-3-AP, a 10^{-9} M, fue similar al de la insulina a 10^{-8} M ($20,7 \pm 1,2$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,001$), alcanzando, además, a esa concentración de péptido, el valor inicial del transporte del azúcar observado en el grupo normal.

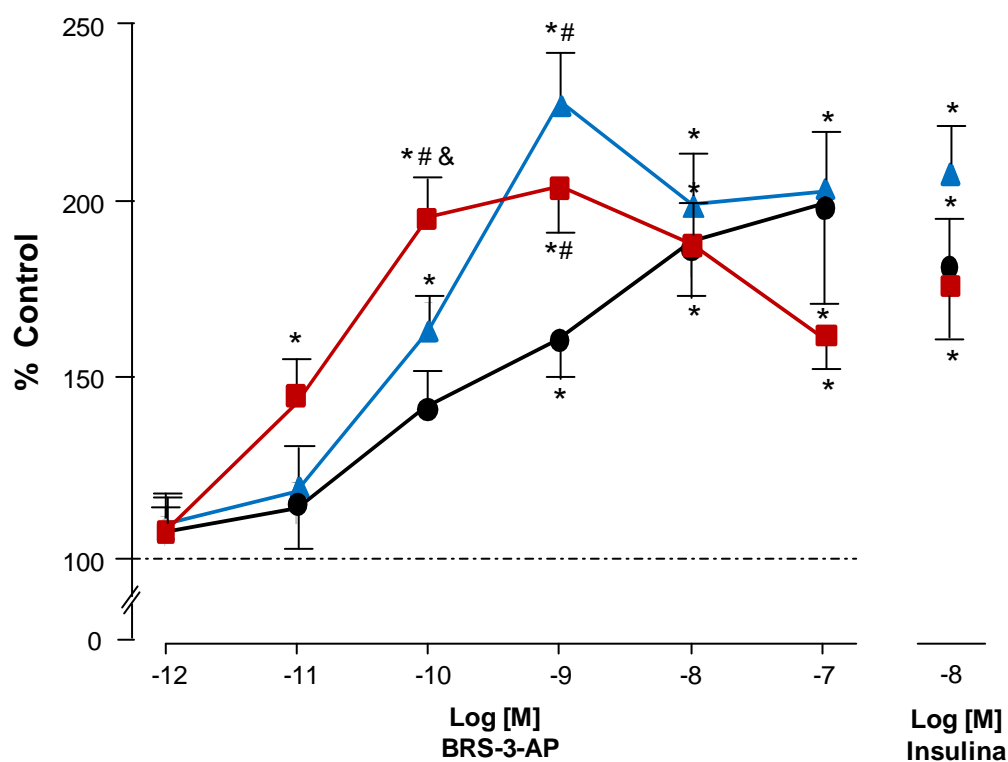


Figura 16. Efecto del BRS-3-AP (10^{-12} – 10^{-7} M), e insulina a 10^{-8} M, sobre el transporte de glucosa, en miotúbulos de 12 sujetos normales (N, ●), 8 pacientes obesos (OB, ▲) y 6 diabéticos (DT2, ■). Los resultados (media±EEM) están expresados en porcentaje del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,01$ vs N; &, $p < 0,05$ vs OB

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=6$), el BRS-3-AP, a 10^{-11} M, produjo una estimulación en la captación de glucosa ($12,0 \pm 1,1$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,01$), que alcanzó el valor máximo a 10^{-10} M ($16,2 \pm 1,0$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,001$) y que se mantuvo constante hasta 10^{-8} M del péptido (10^{-9} M: $16,9 \pm 1,2$ fmoles; 10^{-8} M: $15,6 \pm 0,9$ fmoles, $p < 0,001$). El incremento producido por el BRS-3-AP a 10^{-10} M sobre el transporte de glucosa, fue equivalente al de la insulina a 10^{-8} M ($16,8 \pm 0,9$ fmoles de glucosa/20.000 células, $p < 0,001$), y también fue el mismo que el valor control de captación de glucosa observada en los sujetos normales.

6. VÍAS de SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR en la ACCIÓN del BRS-3-AP sobre el TRANSPORTE de GLUCOSA, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES

En este estudio, ya se ha descrito que el BRS-3-AP, además de incrementar el transporte de glucosa, es capaz de aumentar la actividad del sistema PI3K/PKB, y el grado de fosforilación de la p70s6k y de las p44/p42 MAPKs, tanto en sujetos normales como en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2. Debido a ello, se han investigado las posibles vías de señalización intracelular –PI3K/PKB, p70s6k y p44/p42 MAPKs– involucradas en la acción del BRS-3-AP sobre el transporte de glucosa, por lo que se utilizaron distintos inhibidores específicos de cada enzima. Los resultados de la glucosa captada (**Fig. 17A**), como incorporación de 2-deoxi-D-[1,2- $^3\text{H}(\text{N})$] glucosa, están expresados en porcentaje del valor control, obtenido en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N) incubados en ausencia de péptido e inhibidor.

Tanto la wortmanina –inhibidor del sistema PI3K/PKB– como el PD98059 –inhibidor de las MAPKs– bloquearon, completamente, el efecto estimulador del BRS-3-AP sobre el transporte de glucosa (BRS-3-AP 10^{-8} M + wortmanina 10^{-6} M: $24,8 \pm 1,7$ fmoles de glucosa/20.000 células; BRS-3-AP 10^{-8} M + PD98059 $2,5 \times 10^{-5}$ M: $23,4 \pm 1,2$ fmoles de glucosa/20.000 células, $n=12$, $p < 0,001$ vs BRS-3-AP 10^{-8} M: $42,9 \pm 2,9$ fmoles de glucosa/20.000 células, $n=12$). Sin embargo, la rapamicina –inhibidor de mTOR– no alteró el efecto del BRS-3-AP sobre el transporte de la hexosa (BRS-3-AP 10^{-8} M + rapamicina 10^{-7} M: $37,0 \pm 1,6$ fmoles de glucosa/20.000 células, $n=12$). Para verificar la validez de este último resultado, se estudió el grado de fosforilación de la p70s6K, en miotúbulos procedentes de sujetos normales,

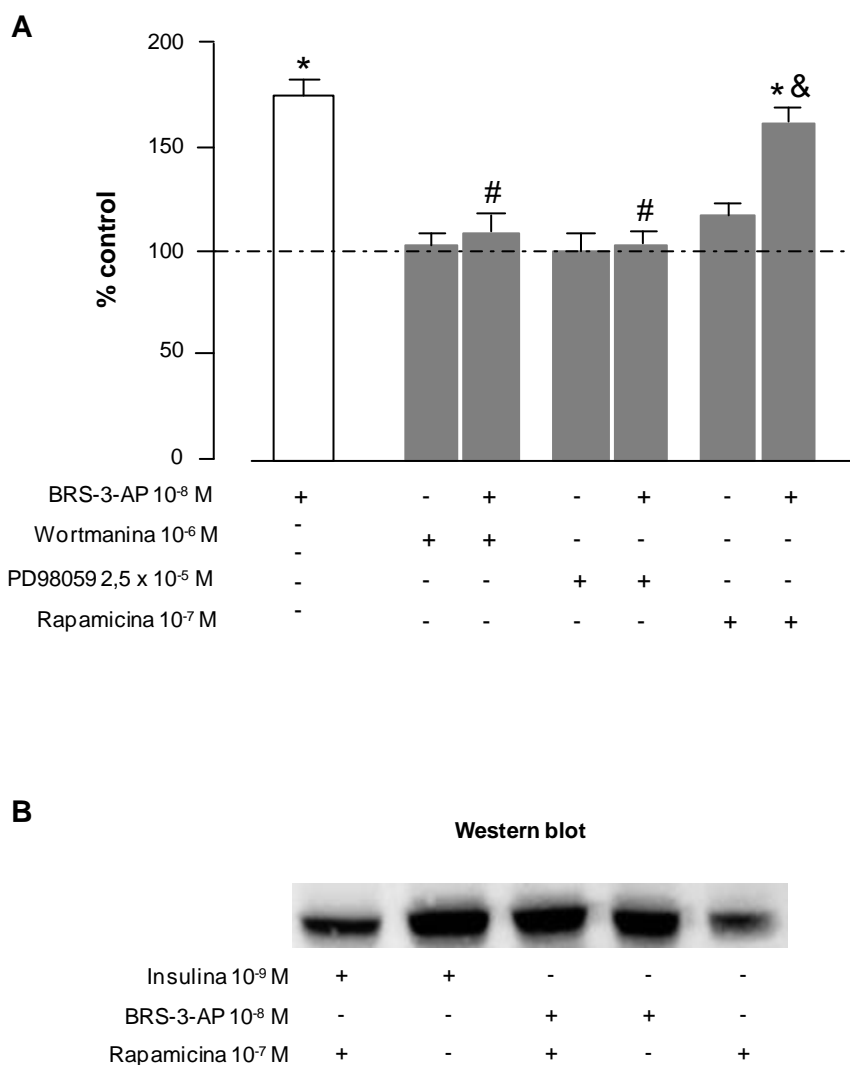


Figura 17. A) efecto de la Wortmanina (inhibidor de PI3K/PKB), PD98059 (inhibidor de MAPKs) y rapamicina (inhibidor de mTOR) sobre el transporte de glucosa, en miotúbulos de 12 sujetos normales incubadas en ausencia (control) o en presencia de BRS-3-AP a 10^{-8} M. Los resultados (media \pm EEM) están expresados en porcentaje del valor medio control, obtenido de células incubadas en ausencia de péptido e inhibidor. *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,001$ vs BRS-3-AP; &, $p < 0,001$ vs rapamicina. **B)** western blot representativo del efecto de la insulina a 10^{-9} M, del BRS-3-AP a 10^{-8} M y de la rapamicina (inhibidor de mTOR) a 10^{-7} M, sobre la actividad p70s6K, en miotúbulos sujeto normal (N=1).

incubados con BRS-3-AP e insulina en ausencia y presencia de rapamicina (**Fig. 17B**), lo cual confirmó que este inhibidor no modifica, por sí mismo, el inducido producido por BRS-3-AP sobre el nivel de fosforilación de la enzima. Sin embargo, el efecto de la insulina sobre la actividad de la p70s6K fue significativamente reducido por la presencia del inhibidor.

La presencia única de cualquiera de los inhibidores utilizados, no modificó el valor control de captación del azúcar.

7. SELECTIVIDAD del BRS-3-AP en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES

El hecho de que no solo el receptor BRS-3, sino también el GRPR, y en menor medida el NMBR, se expresen en el músculo esquelético humano (www.genecards.org), y el que el ligando sintético BRS-3-AP tenga una alta afinidad por los tres receptores de la familia bombesina (Mantey, Coy y col. 2001), podrían cuestionar los efectos insulinomiméticos del agonista sintético del BRS-3 descritos en este trabajo. Con el fin de confirmar el que ellos se deben, exclusivamente, a la unión del BRS-3-AP con el BRS-3, se llevó a cabo el silenciamiento el gen que codifica el receptor BRS-3, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), midiendo, seguidamente, la captación de glucosa inducida por el BRS-3-AP; además, en células no silenciadas (control), se empleó el [D-Phe⁶]bombesin₆₋₁₄ metil ester –ME, antagonista del GRPR–, que permitiría descartar que los efectos producidos por el BRS-3-AP fueran consecuencia de la activación del GRPR por este ligando.

La **figura 18** recoge: **A)** los niveles de ARNm del receptor BRS-3 en células silenciadas, en relación con células no silenciadas (control) ; **B)** la relación del efecto del BRS-3-AP en células silenciadas y no silenciadas (control), sobre el transporte de glucosa –TG–; y **C)** el efecto del ME en células no silenciadas (control), incubadas en ausencia o presencia de BRS-3-AP, sobre el transporte de glucosa. Los resultados están expresados en cantidad relativa –ARNm–, o en porcentaje –transporte de glucosa– del valor medio control, obtenido en células no silenciadas, incubadas en ausencia de péptido.

7.1. Nivel de ARNm BRS-3, en células silenciadas de sujetos normales

Los miotúbulos de sujetos normales, sometidos al silenciamiento del gen que codifica el receptor BRS-3, presentaron una reducción en el ARNm del BRS-3 del 82 % ($p < 0,001$), respecto al valor obtenido en las células control (**Fig. 18A**).

7.2. Efecto del BRS-3-AP en células silenciadas, sobre el transporte de glucosa

La acción estimuladora del BRS-3-AP sobre la captación de glucosa (**Fig. 18B**), previamente detectada en células control, resultó menor ($p < 0,001$) en las células silenciadas; sin embargo, la magnitud del efecto de la insulina fue la misma, tanto en las células control (10^{-8} M: 80 ± 14 % Δ N-control, $p < 0,01$), como en las silenciadas (10^{-8} M: 62 ± 1 % Δ N-células silenciadas, $p < 0,01$).

7.3. Efecto del ME en células no silenciadas, sobre el transporte de glucosa

La presencia de ME –antagonista del GRPR– no alteró el valor de transporte del azúcar, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido, ni tampoco el estímulo producido por el BRS-3-AP (**Fig. 18C**).

8. EFECTO del BRS-3-AP sobre la ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA α y SÍNTESIS DE GLUCÓGENO, en MIOTÚBULOS de SUJETOS NORMALES, de PACIENTES OBESOS y de PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

El glucógeno es el polisacárido de reserva de las células animales, y su síntesis está mediada por la enzima glucógeno sintasa. Debido a la importancia de ambos parámetros, en este trabajo se ha investigado el efecto del BRS-3-AP sobre la actividad glucógeno sintasa α y la síntesis de glucógeno, en sujetos normales, en pacientes obesos y en diabéticos tipo 2. Además, la insulina se ha empleado como control positivo.

La **figura 19** muestra el efecto del BRS-3-AP, e insulina, sobre la actividad glucógeno sintasa α y síntesis de glucógeno, en miotúbulos procedentes de sujetos normales (N), de pacientes obesos (OB) y de diabéticos tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados en porcentaje de incremento del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

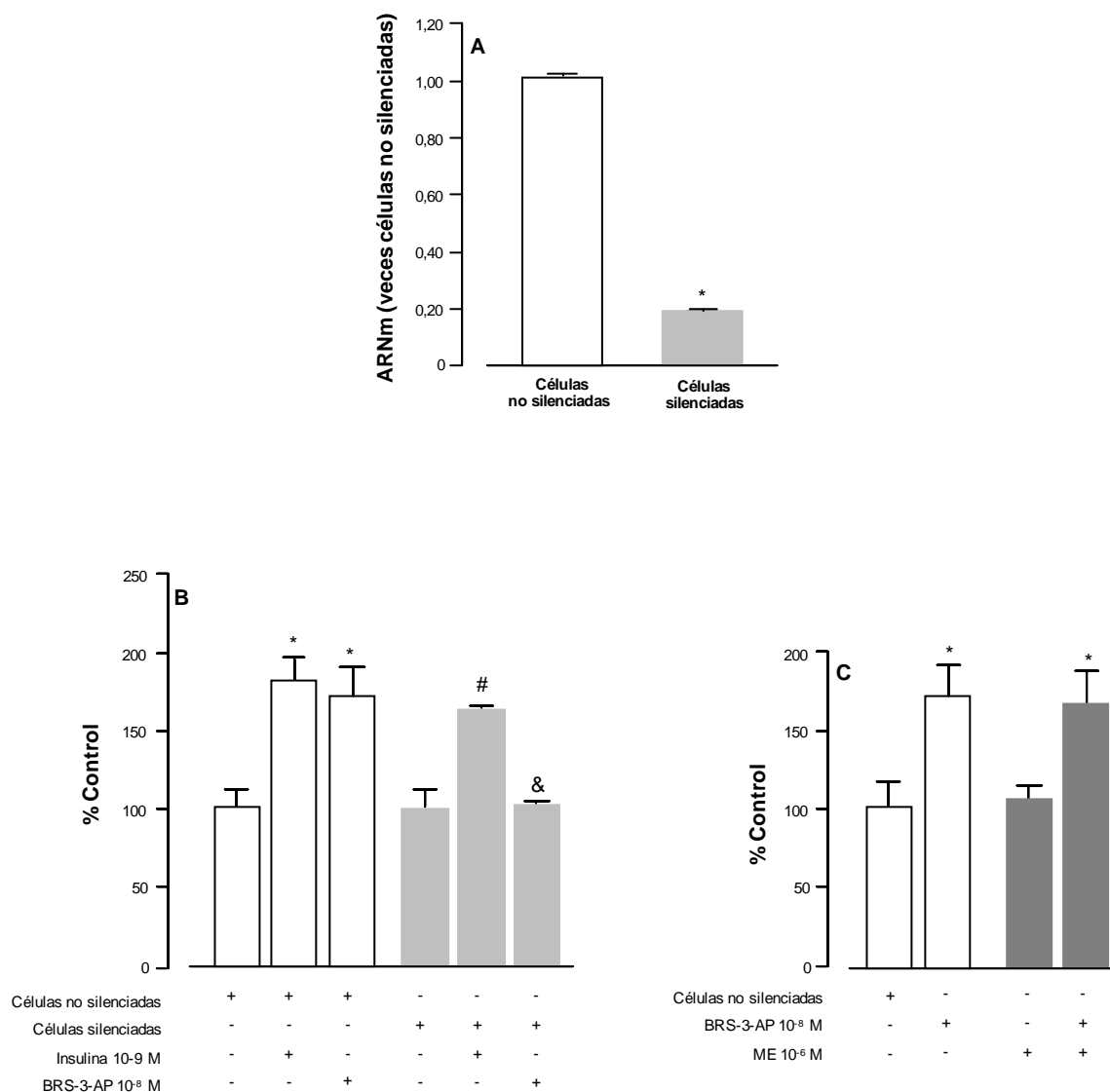


Figura 18. En miotúbulos de sujetos normales **A)** ARNm del receptor BRS-3 en células silenciadas, en relación con las células no silenciadas, en los miotúbulos de sujeto normal (N=1). **B)** efecto del BRS-3-AP en células silenciadas y no silenciadas, sobre el transporte de glucosa, en los miotúbulos de sujeto normal (N=1). **C)** efecto del ME en células no silenciadas sobre el transporte de glucosa, en los miotúbulos de 5 sujetos normales. Los resultados (media±EEM) están expresados en cantidad relativa (ARNm) o en porcentaje –TG– del valor medio de su propio grupo control, obtenido en células no silenciadas incubadas en ausencia de péptido. *, $p<0,05$ vs células no silenciadas; #, $p<0,01$ vs células silenciadas; &, $p<0,001$ BRS-3-AP en células silenciadas vs BRS-3-AP en células no silenciadas.

8.1. Actividad glucógeno sintasa α

El valor control de actividad de la enzima –medida como formación de glucógeno a partir de UDP- ^{14}C –glucosa–, en células de pacientes obesos ($21,1 \pm 3,3$ mU/mg, $n=10$) y de diabéticos tipo 2 ($22,0 \pm 2,4$ mU/mg, $n=9$), fue, en ambos grupos, inferior ($p < 0,01$), al observado en sujetos normales ($48,2 \pm 5,9$ mU/mg, $n=10$).

En sujetos normales ($n=10$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, incrementó la actividad glucógeno sintasa α (**Fig. 19A**), efecto que se mantuvo a 10^{-9} M (10^{-10} M: $71,5 \pm 3,4$ mU/mg, $p < 0,01$; 10^{-9} M: $77,8 \pm 9,3$ mU/mg, $p < 0,02$), y que alcanzó el valor máximo a 10^{-8} M ($99,1 \pm 8,7$ mU/mg, $p < 0,001$). El estímulo observado con BRS-3-AP a 10^{-8} M fue similar al obtenido con insulina a 10^{-9} M ($88,3 \pm 9,0$ mU/mg, $p < 0,01$).

En los pacientes obesos ($n=10$), la actividad glucógeno sintasa α (**Fig. 19A**) aumentó a 10^{-10} M de BRS-3-AP, manteniéndose el efecto hasta 10^{-8} M (10^{-10} : $29,0 \pm 1,3$ mU/mg, 10^{-9} : $34,2 \pm 4,4$ mU/mg; 10^{-8} : $28,6 \pm 2,3$ mU/mg $p < 0,05$), siendo, además, en todos los casos, similar a lo detectado con insulina (10^{-9} M: $31,4 \pm 1,9$ mU/mg, $p < 0,05$).

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=9$), el BRS-3-AP, a 10^{-11} M, estimuló la actividad glucógeno sintasa α ($33,7 \pm 2,0$ mU/mg, $p < 0,01$), cuyo valor resultó ser, sorprendentemente, ya máximo; a partir de ahí, la actividad de la enzima se mantuvo constante al resto de concentraciones estudiadas (10^{-10} M: $30,8 \pm 2,0$ mU/mg; 10^{-9} M: $31,1 \pm 1,9$ mU/mg; 10^{-8} M: $29,8 \pm 1,3$ mU/mg, $p < 0,02$). La insulina (10^{-9} M: $31,4 \pm 1,9$ mU/mg, $p < 0,01$) aumentó la actividad de la enzima en magnitud similar a la producida por BRS-3-AP (**Fig. 19A**).

8.2. Síntesis de glucógeno

En células procedentes de pacientes obesos y de diabéticos tipo 2, incubadas en ausencia de péptido, la incorporación de D-[U- ^{14}C] glucosa en glucógeno (OB: $8,2 \pm 0,1$ nmol/mg, $n=4$ y DT2: $10,4 \pm 1,4$ nmol/mg, $n=4$) fue menor ($p < 0,01$) que la de las células de sujeto normal ($13,6 \pm 0,8$ nmol/mg, $n=5$).

En el grupo normal ($n=5$), la síntesis de glucógeno (**Fig. 19B**) aumentó a 10^{-9} M de BRS-3-AP ($19,6 \pm 1,1$ nmol/mg, $p < 0,01$), alcanzando un máximo a 10^{-8} M del péptido ($23,3 \pm 2,0$ nmol/mg, $p < 0,01$). La estimulación producida por BRS-3-AP a 10^{-8} M fue similar a la obtenida con insulina a 10^{-9} M ($23,8 \pm 3,4$ nmol/mg, $p < 0,02$).

En los pacientes obesos ($n=4$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, incrementó la síntesis de glucógeno ($10,6 \pm 0,6$ nmol/mg, $p < 0,01$), alcanzando el máximo valor a 10^{-9} M del péptido ($14,0 \pm 1,1$ nmol/mg, $p < 0,05$); este efecto fue, a su vez, similar al observado tanto concentraciones equimolares de insulina ($12,7 \pm 0,4$ nmol/mg, $p < 0,001$), como al valor control de síntesis de glucógeno en las células de sujeto normal (**Fig. 19B**).

En los pacientes diabéticos tipo 2 ($n=4$), el BRS-3-AP, a 10^{-10} M, produjo un incremento en la síntesis de glucógeno (**Fig. 19B**), que permaneció estable hasta 10^{-8} M del péptido (10^{-10} M: $14,4 \pm 1,3$ nmol/mg; 10^{-9} M: $16,5 \pm 1,1$ nmol/mg; 10^{-8} M: $16,6 \pm 1,3$ nmol/mg $p < 0,01$); además, este efecto estimulador del BRS-3-AP fue el mismo que el obtenido con insulina (10^{-9} M: $17,1 \pm 1,2$ nmol/mg, $p < 0,01$), e igualó el valor control de este parámetro en el sujeto normal.

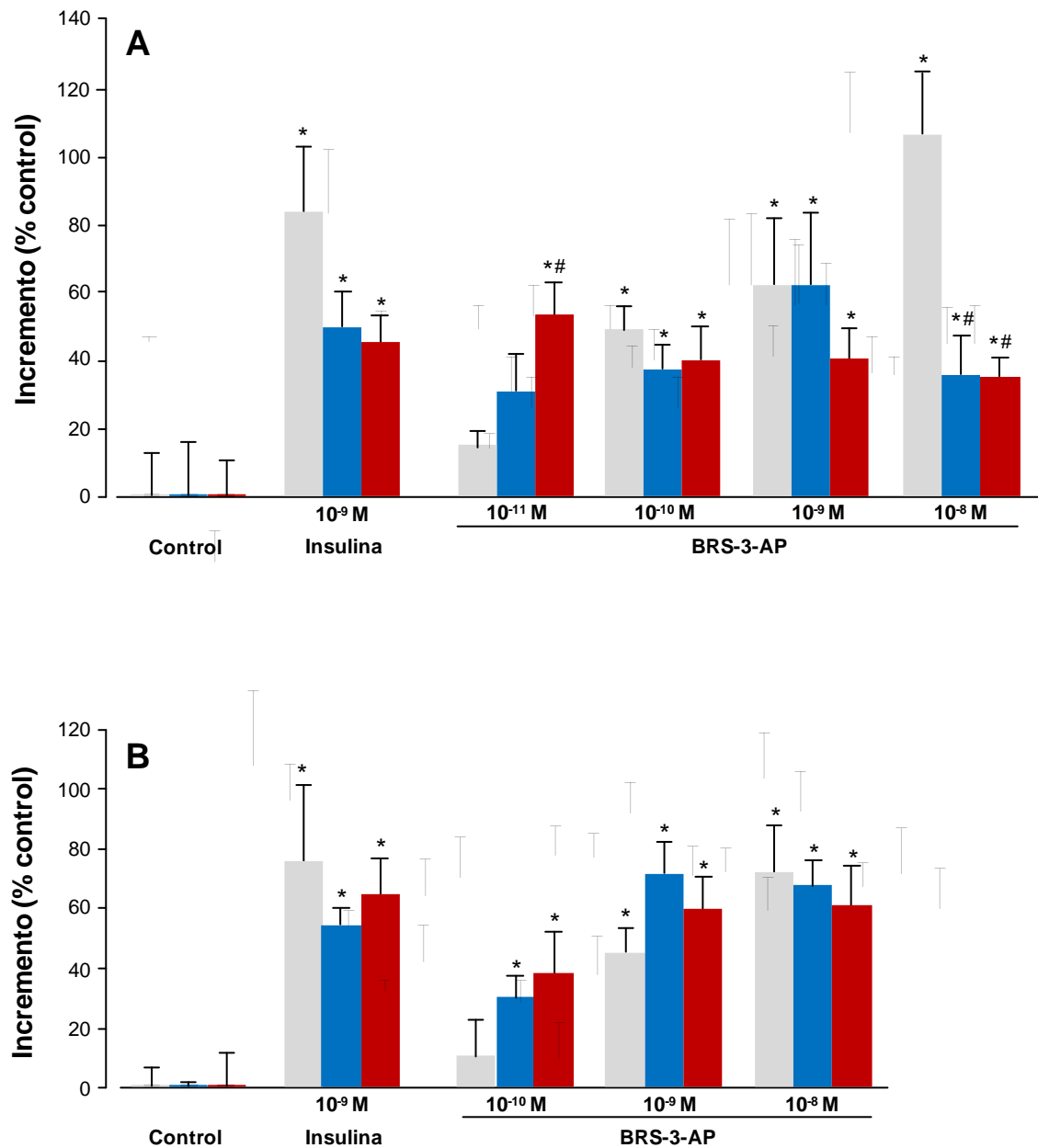


Figura 19. Efecto del BRS-3-AP, e insulina, sobre **A)** Actividad glucógeno sintasa α , en miotúbulos de 10 sujetos normales (N, \square), 10 pacientes obesos (OB, \blacksquare) y 9 diabéticos tipo 2 (DT2, \blacksquare). **B)** Síntesis de glucógeno, en miotúbulos de 5 sujetos normales (N, \square), 4 pacientes obesos (OB, \blacksquare) y 4 diabéticos tipo 2 (DT2, \blacksquare). Los resultados (media \pm EEM) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio de su propio grupo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido (control). *, $p < 0,05$ vs propio grupo control; #, $p < 0,01$ vs N.

DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra la relación del Receptor Bombesina Subtipo 3 con la fisiopatología de la glucosa en el hombre; de hecho, los resultados ilustran la implicación del BRS-3 en los mecanismos de metabolización de la hexosa, tanto en estado normal como en aquellos que cursan, o pueden cursar, con un metabolismo de la glucosa alterado.

Varios estudios, realizados en modelos experimentales de ratón deficientes del receptor BRS-3, sugirieron que este receptor era responsable del origen de alteraciones de carácter metabólico (Ohki-Hamazaki, Wada y col. 1997; Matsumoto, Yamada y col. 2003); en concreto, en esos ratones, se observó, entre otros efectos, un desarrollo de obesidad leve asociado con hipertensión, una reducción en la tasa metabólica, un incremento en la ingestión de alimentos, hiperfagia, un aumento de la concentración circulante de leptina y un incremento en los niveles de insulina en sangre (Ohki-Hamazaki, Wada y col. 1997; Matsumoto, Yamada y col. 2003).

En el hombre, sin embargo, al margen de un estudio en islotes pancreáticos, en el que se sugiere que el BRS-3 regula la secreción de insulina inducida por glucosa (Feng, Guan y col. 2011), la información relativa su posible papel en los procesos relacionados con los mecanismos de metabolización del azúcar, es prácticamente nula. En base a ello, este trabajo se ha realizado en un tejido esencial en la homeostasis de la glucosa, el músculo esquelético, en el que se expresa el receptor (www.genecards.org). Este tejido ha sido analizado en sujetos normales, en pacientes obesos, y en diabéticos tipo 2, de los que, además, se han aislado y diferenciado células musculares, porque el miotúbulo conserva las características metabólicas del propio tejido (Ciaraldi, Abrams y col. 1995; Henry, Abrams y col. 1995), convirtiéndose así en un sistema idóneo para el estudio del metabolismo de la hexosa en el hombre (González, Acitores y col. 2005; González, Sancho y col. 2005; Luque, González y col. 2002; Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo documentan, primero, la presencia del receptor BRS-3, tanto en el músculo como en los miotúbulos de sujetos normales y de pacientes obesos y diabéticos tipo 2; segundo, que la expresión de este receptor –ARNm y proteína– fue inferior en los obesos, y aún menor en los diabéticos tipo 2, en

relación con los sujetos normales, lo cual está en consonancia con la premisa de que la disrupción del gen BRS-3 sería responsable del origen de alteraciones metabólicas, como la obesidad (Ohki-Hamazaki, Wada y col. 1997; Matsumoto, Yamada y col. 2003); y tercero, que la magnitud de la diferencia en el nivel de ARNm y en el de proteína del receptor BRS-3 entre los pacientes –obesos y diabéticos tipo 2– y el sujeto normal, fue más acusada en función del sistema utilizado, resultando mayor en las piezas de músculo que en las células musculares aisladas y diferenciadas.

Al examinar las características metabólicas de los sujetos participantes en este estudio, se observa, en los pacientes obesos, un nivel de glucosa en sangre más alto de lo normal, siendo aún mayor en los diabéticos tipo 2, que va acompañado de una menor expresión del receptor BRS-3 –ARNm y proteína– en el músculo de los obesos, e incluso menor en el de los diabéticos; y esto parece indicar una relación inversa entre ambos parámetros, glucemia y expresión del receptor en este tejido. De hecho, resultados preliminares de nuestro laboratorio (Moreno-Villegas, Ramos-Álvarez y col. 2012), obtenidos en modelos experimentales con distintos estadios del metabolismo de la glucosa alterado –resistencia a insulina, hiperlipidemia, diabetes tipo 2 y tipo 1–, documentan que, concretamente en la grasa de ratas insulinoresistentes, con una glucosa circulante similar a la del grupo control, el ARNm del BRS-3 fue igual a la de la rata normal. Sin embargo, en el resto de los modelos –con valores de glucemia más altos–, se detectó un nivel de ARNm reducido (Moreno-Villegas, Ramos-Álvarez y col. 2012). Por otro lado, en los miotúbulos procedentes de los pacientes obesos, y en los de diabéticos tipo 2, cultivados con una misma concentración de glucosa durante 4-6 semanas, si bien se observa la misma tendencia, esa diferencia obtenida en los niveles de ARNm y proteína del receptor no es tan evidente como la detectada en las piezas de músculo. La suma de estas observaciones sugiere que el nivel de glucosa circulante puede afectar a la expresión del receptor.

Por otra parte, el perfil lipídico de cada uno de ellos –normales, obesos y diabéticos tipo 2–, se mantuvo dentro del rango esperado, sin que se manifestaran evidencias clínicas de que los pacientes obesos participantes en este estudio fuesen resistentes a insulina; además, ninguno de los sujetos normales ni de los pacientes obesos estaba bajo medicación, si bien los diabéticos tipo 2 recibían una dosis diaria de insulina. No obstante, tanto la pieza de músculo, como los miotúbulos –que estuvieron durante 4-6

semanas en un medio libre de insulina— procedentes de este grupo de pacientes, mostraron una reducción en el nivel de ARNm y en los valores de proteína del receptor, que también fue detectada en los obesos, lo cual sugiere que el tratamiento con insulina no es determinante en la expresión del BRS-3 –ARNm y proteína—. La diversidad del tipo de intervención quirúrgica a la que cada sujeto fue sometido, permitió descartar que la localización del tejido muscular estudiado condicionara la cualidad de los resultados. Finalmente, los pacientes diabéticos tipo 2 tenían una edad media superior tanto a la de los sujetos normales como a la de los pacientes obesos, posiblemente debido a que ciertas intervenciones quirúrgicas no son necesarias, en general, en edad temprana; a pesar de lo anterior, en los miotúbulos procedentes de los diabéticos no se detectaron modificaciones en su crecimiento ni tampoco en su desarrollo, respecto a lo observado en células de sujeto normal o en las de pacientes obesos. Esto último coincide con resultados preliminares de nuestro laboratorio (Moreno-Villegas, Ramos-Álvarez y col. 2012), obtenidos del estudio realizado en modelos experimentales en la rata, todas de la misma edad, y con distintos estadios alterados del metabolismo de la glucosa –resistencia a insulina, hiperlipidemia, diabétes tipo 2 y tipo 1–, en el que se detectó una reducción en el nivel de ARNm del receptor BRS-3, tanto en la rata hiperlipidémica como en la diabética tipo 2 (Moreno-Villegas, Ramos-Álvarez y col. 2012). Todo lo anterior indica que ninguno de estos parámetros –perfil lipídico, resistencia a insulina, medicación, intervención quirúrgica y edad– parecen estar ligados, directamente, con la expresión del receptor BRS-3.

Al estudiar el efecto del agonista de alta afinidad BRS-3-AP, y el de la insulina, sobre el nivel de ARNm y de proteína del receptor BRS-3 en los miotúbulos procedentes de los tres grupos, se observa, en todos ellos, que el BRS-3-AP no solo tiene un efecto estimulador sobre ambos parámetros, sino que, por añadidura, las células musculares de los pacientes obesos son más sensibles, y aún más las de los diabéticos tipo 2, que las del sujeto normal. La insulina también indujo un incremento en la expresión del BRS-3 –ARNm y proteína–, lo que parece indicar que esta hormona participa en su regulación, tal y como ocurre con otros genes y en otros tejidos en los que se expresa el receptor de insulina. Así, por ejemplo, en una línea celular de fibroblastos de ratón –NIH 3T3–, se demostró que la activación de p21 ras inducida por insulina –tras la unión de esta a su receptor específico–, además de ser un paso intermedio en el

mecanismo de señalización de la hormona, conduce a la activación de la expresión génica (Burgering, Medema y col. 1991; Pandini, Medico y col. 2003).

Al margen de lo anterior, en este trabajo se ha descartado la posible relación entre el tratamiento médico previo del diabético con insulina y la expresión del receptor BRS-3 –ARNm y proteína–. Las diferencias observadas en este estudio, con relación al músculo de pacientes diabéticos tratados con insulina, y el efecto de la insulina *in vitro*, que podría considerarse directo de la hormona, es algo dado ya comúnmente en investigaciones sobre agentes, que incluyen valoraciones *in vivo* e *in vitro*. De hecho, en los dos grupos de pacientes, el valor relativamente reducido respecto al normal, en la expresión al BRS-3, fue más acusado en el tejido completo y fresco que en las células aisladas y diferenciadas –obtenidas tras 4-6 semanas en un medio libre de insulina–. Por otro lado, en las células se detecta, con claridad, un estímulo inducido por insulina, que tanto en los obesos como en los diabéticos tiende hacia la normalización de los valores.

Los resultados de este estudio muestran que la unión del ligando sintético BRS-3-AP con el receptor BRS-3 activa distintas vías de señalización intracelular, tanto en las células musculares de los sujetos normales como en las de los pacientes obesos y diabéticos tipo 2. En la literatura, sin embargo, los trabajos relacionados con la señalización del BRS-3, son escasos, y los existentes se refieren a la implicación del BRS-3 en el crecimiento y desarrollo tumoral (Jensen, Battey y col. 2008). No obstante, en estudios centrados en los mecanismos de señalización intracelular de los GRPR que, al igual que el BRS-3, pertenecen a la familia de receptores bombesina, se ha documentado que, en dos líneas celulares de glioma –C6 y la U-87MG–, y en otras dos de neuroblastoma –SK-N-SH y BE(2)-C–, la activación de la PI3K era necesaria para la proliferación celular y, en concreto, para el crecimiento de la célula tumoral (Flores, Farias y col. 2005; Ishola, Kang y col. 2007). Además, en otro estudio realizado en una línea celular de neuroblastoma –BE(2)-C–, en la que se silenció el gen que codifica a GRPR, se informó de que la actividad del sistema PI3K/Akt, mediador esencial de la supervivencia celular y de la metástasis, fue menor que la observada en células no silenciadas, detectándose también una reducción en los niveles de *p*-p70S6K y de *p*-S6, ambos reguladores clave de la síntesis de proteínas y metabolismo celular (Qiao, Kang y col. 2008).

Por otra parte, en trabajos previos realizados en miotúbulos humanos, se determinó que el paciente obeso, pero no el diabético tipo 2, tiene, en general, una actividad quinasa menor que la de sujetos normales, a excepción de la PI3K en el diabético, que está hiperactivada (González, Acitores y col. 2005; González, Sancho y col. 2005; Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011). A pesar de ello, todas las enzimas analizadas en el presente trabajo –PI3K/PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1–, y en los tres grupos estudiados, responden, con distinta eficiencia al BRS-3-AP y también a la insulina.

Al analizar el efecto del BRS-3-AP sobre el sistema PI3K/PKB, se observó que, en miotúbulos procedentes de sujetos normales, el BRS-3-AP, a 10^{-8} M, induce un aumento máximo en la actividad de ambas enzimas. Sin embargo, en los pacientes obesos, con un nivel basal del sistema PI3K/PKB, menor que el detectado en sujetos normales (Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011), el BRS-3-AP incrementa esa actividad quinasa, ya a 10^{-9} M; y en las células musculares aisladas de los diabéticos tipo 2, en las que actividad basal PI3K es mayor (González, Sancho y col. 2005), y en las que el grado de fosforilación inicial de la PKB es similar al observado en los sujetos normales (González, Sancho y col. 2005), el ligando sintético del BRS-3, a 10^{-10} M, estimula, en cualquier caso, la actividad del sistema.

En la compleja señalización intracelular del metabolismo de la glucosa, también ha sido implicada la p70s6K (González, Acitores y col. 2005; González, Sancho y col. 2005; Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011). En el presente estudio, se ha detectado que el BRS-3-AP, a 10^{-8} M en miotúbulos procedentes de sujetos normales, y a 10^{-10} M en los pacientes diabéticos tipo 2, induce un aumento en la fosforilación de esta quinasa, aun no habiendo diferencias en el nivel inicial de la enzima en ambos grupos (González, Sancho y col. 2005). En los obesos, que parten de un valor basal disminuido (Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011), el BRS-3-AP, a 10^{-9} M, incrementó el grado de fosforilación de la p70s6K.

Además, el BRS-3-AP aumentó la fosforilación de las p42 y p44 MAPK, a 10^{-8} M en las células musculares de sujetos normales, y a 10^{-9} M en las de los pacientes obesos, a pesar, estos últimos, de tener una actividad basal inferior a lo normal (Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011); en los pacientes diabéticos tipo 2, cuyo nivel inicial fue similar al normal (González, Sancho y col. 2005), ese máximo se alcanzó a 10^{-10} M del péptido. Estos resultados concuerdan con trabajos previos de otros investigadores, realizados en una línea celular de cáncer de pulmón humano transfectada con el receptor BRS-3

–NCI-H1299–, en la que se observó que la unión del BRS-3-AP con el receptor BRS-3, estimula Elk-1 de manera dependiente de MEK-1, resultando en un aumento en la expresión de ARNm de c-fos (Weber, Walters y col. 2001). Además, en esa misma línea celular –NCI-H1299–, y en otra de fibroblastos de ratón –Balb-3T3–, ambas transfectadas con el BRS-3 humano mediante la utilización de distintos agonistas sintéticos del BRS-3 –entre los que destaca el [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bombesin_{6–14}–, se demostró que la activación del receptor media la fosforilación de CREB y su transactivación, a través, aunque de manera parcial, de PKA, PKC y MEK-1 (Qin, Qu y col. 2012).

Por otro lado, el BRS-3-AP, a 10^{-8} M en miotúbulos de sujetos normales, a 10^{-9} M en los de pacientes obesos, y a 10^{-10} M en los de diabéticos tipo 2, indujo un aumento máximo en la fosforilación de la p90 RSK-1, sin que se observaran diferencias en la actividad inicial de la enzima entre los tres grupos. Al analizar estos resultados, parece lógico que el patrón detectado, en relación con la estimulación producida por BRS-3-AP sobre la actividad de la p90 RSK-1, curse en paralelo con un aumento en la fosforilación de las MAPKs, ya que, tal y como se ha documentado, el incremento de estas ha de ser previo al de la p90 RSK-1 (De Cesare, Jacquot y col. 1998; Song, Sugimoto y col. 2007).

El efecto máximo inducido por BRS-3-AP, a 10^{-8} M en sujetos normales, a 10^{-9} M en los pacientes obesos y a 10^{-10} M en los diabéticos tipo 2, sobre la actividad de todas estas quinasas –PI3K/PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1–, apoya la idea de que la célula muscular del obeso y, aún más, la del diabético tipo 2, desarrolla una sensibilidad a la acción del péptido, mayor que la del sujeto normal. Además, el incremento máximo detectado en la actividad de PI3K/PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1, que se logra a distintas concentraciones del BRS-3-AP es, en general, igual en los tres grupos estudiados, y también equivalente al efecto producido por inulina. Ello confirma que los pacientes obesos y los diabéticos tipo 2 de este estudio son más sensibles a la acción del péptido que los sujetos normales, y sugiere, además, que el BRS-3-AP activa vías de señalización comunes, al menos algunas, a las de la insulina (Taha y Klip 1999).

Se sabe desde hace mucho tiempo que la insulina estimula el transporte de glucosa (Cushman y Wardzala 1980; Klip, Ramlal y col. 1986), lo cual queda confirmado, una vez más, en este trabajo. Por otro lado, las células de los pacientes obesos y los diabéticos de este

estudio, a pesar de tener un nivel inicial de transporte de glucosa, inferior al observado en el sujeto normal, no solo conservan su capacidad de respuesta a la insulina y, también, al BRS-3-AP, sino que, este ligando del BRS-3, en ambos grupos, produce una normalización de los valores de captación del azúcar. Además, la estimulación máxima producida por BRS-3-AP, a 10^{-8} M en los sujetos normales, a 10^{-9} M en los pacientes obesos, y a 10^{-10} M en los diabéticos tipo 2, es similar en los tres grupos estudiados, y también a la obtenida con la insulina (González, Acitores y col. 2005, González, Sancho y col. 2005; Villanueva-Peñacarrillo, Martín-Duce, 2011), lo cual parece indicar, de nuevo, que las células de pacientes con una glucemia alterada, desarrollan una mayor sensibilidad al BRS-3-AP, y que este agonista es mimético a la insulina, al menos en esta acción.

En relación con las vías de señalización de la insulina y de otras hormonas con efectos insulinomiméticos –como el GLP-1–, se ha postulado que el sistema PI3K/PKB y las enzimas p70s6K y MAPKs son decisivas en sus acciones (Acitores, González y col. 2005; González, Sancho y col. 2005; Redondo, Trigo y col., 2003, Taha y Klip 1999). En este trabajo, se documenta que el efecto estimulador del BRS-3-AP sobre el transporte de glucosa en miotúbulos procedentes de sujetos normales, es bloqueado tanto por Wortmanina como por PD98059 y, parcialmente, por rapamicina. Asimismo, este último también reduce, pero no anula, el grado de fosforilación de la p70s6K inducido por BRS-3-AP, lo que indica que un incremento en la actividad de la PI3K/PKB y de las MAPKs es determinante en el efecto del BRS-3-AP sobre la captación de glucosa, y que la p70s6K, si bien interviene, su función no es determinante en esta acción del péptido. Ello corrobora la premisa de que el BRS-3-AP estimula vías de señalización comunes a la insulina (González, Sancho y col. 2005; Taha y Klip 1999). Por otra parte, la inhibición parcial de la actividad p70s6k sobre el transporte de glucosa, inducido, en este caso, por BRS-3-AP, había sido ya descrita en relación con el GLP-1 (Acitores, González y col. 2005; González, Sancho y col. 2005).

En el presente estudio se ha analizado la expresión –ARNm y proteína– de uno de los parámetros específicamente relacionado con el transporte de glucosa (Kandror y Pilch 1996; Zorzano, Wilkinson y col. 1989), el Glut-4. Los resultados muestran que su valor inicial de ARNm y proteína citoplasmática no es distinto en ninguno de los tres grupos estudiados; sin embargo, en los pacientes obesos y en los diabéticos tipo 2, se detectó una cantidad de proteína de membrana disminuida en relación con la del normal, lo

cual está en consonancia con trabajos previos de otros investigadores (Arnés, Moreno y col. 2008; Sancho, Trigo, 2006; Stuart, Wen y col. 2001; Villanueva-Peñacarrillo, Puente, y col. 2001). De hecho, se documentó que, en el músculo de pacientes insulinoresistentes, los niveles tanto de ARNm del Glut-4 como los de su proteína total, eran similares a los del tejido del sujeto normal (Stuart, Wen y col. 2001); también, informaron sobre una redistribución del Glut-4 a la superficie celular en estos pacientes (Stuart, Wen y col. 2001), lo que parece indicar que tienen un mecanismo de translocación del glucotransportador, deficiente. En el músculo esquelético de un modelo de rata diabética tipo 2, no se detectaron diferencias en el nivel de ARNm del Glut-4, con respecto a la rata normal (Arnés, Moreno y col. 2008; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001), aunque sí se documentó un valor disminuido de la proteína de membrana (Arnés, Moreno y col. 2008; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001). En otro estudio, realizado en adipocitos procedentes de pacientes obesos, tampoco se observaron diferencias en el valor de ARNm del Glut-4, pero sí en el contenido de proteína (Sancho, Trigo y col. 2006). Por último, en adipocitos aislados de ratón, con una expresión del receptor BRS-3 deficiente, a pesar de que tanto los niveles de ARNm como los de proteína Glut-4 total eran similares a los del control, su distribución mostró marcadas diferencias, lo que sugiere un mecanismo de translocación del glucotransportador alterado, coincidente con una reducida expresión génica del BRS-3 (Nakamichi, Wada y col. 2004).

En relación con lo anterior, la a insulina 10^{-9} M, y el BRS-3-AP a 10^{-8} M en los sujetos normales, a 10^{-9} M en los pacientes obesos y a 10^{-10} M en los diabéticos tipo 2, aumentaron el nivel de ARNm y los valores de proteína de la membrana plasmática del Glut-4, incidiendo, de nuevo, en la hipótesis de que la célula del paciente obeso y, aún más, la del diabético tipo 2, tienen una mayor sensibilidad a este agonista que la del sujeto normal, al margen de que el BRS-3-AP favorece, de forma general, la translocación del Glut-4 en el músculo. Estos resultados concuerdan con informaciones previas de otros autores (Arnés, Moreno y col. 2008; Guma, Zierath y col. 1991; Moreno, Nuche-Berenguer y col. 2011; Nakamichi, Wada y col. 2004; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001); en concreto, en el músculo esquelético del hombre, se informó de que la insulina induce la translocación del Glut-4 a la membrana plasmática (Guma, Zierath y col. 1991); asimismo, en un modelo de rata diabética tipo 2, se observó que la insulina, y otras hormonas y péptidos con efectos insulinomiméticos, como el GLP-1 y la exendina 4 –Ex-4–, estimulan la expresión del Glut-4 –ARNm y proteína–, tanto en el músculo esquelético como en el

tejido adiposo (Arnés, Moreno y col. 2008; Moreno, Nuche-Berenguer y col. 2011; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001). Además, en adipocitos aislados de ratones con una expresión del receptor BRS-3 deficiente, se documentó que la insulina no favorecía la translocación del Glut-4 a la membrana, pero sí lo hacía en las células de ratón control (Nakamichi, Wada y col. 2004), lo cual apoya la hipótesis de que un mecanismo de translocación del Glut-4 descompensado, cursa en paralelo con una expresión del BRS-3, alterada (Nakamichi, Wada y col. 2004).

Los resultados hasta aquí expuestos confirman postulados previos de otros investigadores que, utilizando una línea celular de fibroblastos de ratón diferenciados a adipocitos –3T3-L1–, documentaron que un incremento inducido por insulina en la actividad tanto de la PI3K como de la PKB es necesario para que se inicie el mecanismo de translocación del Glut-4 (Isakoff, Taha y col. 1995; Frevert y Kahn 1997; Shepherd, Withers y col. 1998; Litherland, Hajduch y col. 2001) y, con ello, un aumento en la captación de glucosa (Czech y Corvera 1999), tal y como se observa sobre el BRS-3-AP en este trabajo.

Dos de los parámetros claves en el metabolismo celular son la actividad glucógeno sintasa α y la síntesis de glucógeno. En este estudio, se ha observado que células musculares procedentes de sujetos normales responden al BRS-3-AP en relación con estos dos parámetros; además, se ha detectado que los miotúbulos de pacientes obesos y de diabéticos tipo 2, mantienen su capacidad de respuesta no solo a la insulina, sino también al BRS-3-AP. Este ligando produce, sobre la actividad glucógeno sintasa α , un incremento que fue detectado a 10^{-8} M en los sujetos normales, a 10^{-9} M en los obesos, y ya desde 10^{-11} M en los diabéticos tipo 2; por otro lado, el efecto estimulador del BRS-3-AP sobre la síntesis de glucógeno fue visible a 10^{-8} M en los sujetos normales, a 10^{-9} M en los obesos y a 10^{-10} M en los diabéticos tipo 2, alcanzando, incluso, en los dos grupos de pacientes, el valor del control normal de síntesis de glucógeno.

Esta diferencia en la sensibilidad de la célula, en función de la característica metabólica del grupo, detectada en la acción, en este caso, del BRS-3-AP, sobre la actividad glucógeno sintasa α y síntesis de glucógeno, ha sido informada por otros investigadores en estudios sobre otras hormonas y péptidos en células musculares humanas (González, Sancho y col. 2005; Luque, González y col. 2002). Específicamente, un trabajo realizado en miotúbulos de sujetos normales y de diabéticos tipo 2, mostró que, en los diabéticos, eran necesarias concentraciones de 10^{-10} M de insulina, o GLP-1, para conseguir un

máximo en la actividad de la enzima, mientras que el mayor incremento en la síntesis de glucógeno se observaba a 10^{-9} M (González, Sancho y col. 2005; Luque, González y col. 2002). Estas diferencias pudieran ser debidas a la existencia de procesos intermedios que afectan a la señal entre el incremento en la actividad de la enzima y la síntesis de glucógeno. En concreto, la insulina y el GLP-1, en el hepatocito de rata (López-Delgado, Morales y col. 1998), y la insulina y el GLP-1, en miotúbulos humanos (Luque, González y col. 2002), incrementan la actividad glucógeno sintasa a los 10-15 min, mientras que el aumento máximo en la síntesis de glucógeno inducido por estos péptidos, no se produce hasta los 60 min de incubación (Luque, González y col. 2002). Lo anterior concuerda con lo observado sobre otros parámetros estrechamente relacionados y dependientes entre sí, como es el caso del sistema PI3K/PKB que, en miotúbulos humanos, tratados con GLP-1, Ex-4 y exendina 9 –Ex-9–, se logra el aumento máximo de actividad a los 3 min (González, Sancho y col. 2005; Villanueva-Penacarrillo, Martín-Duce y col. 2011), cuando en una línea celular de miotúbulos de rata –L6-GLUT4myc–, la translocación del Glut-4 mediada por Akt y ERK1/2 no se detectó hasta los 20-30 min de exposición a la insulina o al ácido palmítico (Pu, Peng y col. 2011).

Los resultados del presente trabajo documentan que las células musculares procedentes de pacientes obesos y de diabéticos tipo 2 tienen una actividad glucógeno sintasa a, inferior a la del sujeto normal. Esto confirma observaciones previas en miotúbulos procedentes de los dos mismos grupos (Luque, González y col. 2002; González, Sancho y col. 2005; Villanueva-Penacarrillo, Martín-Duce y col. 2011). Sin embargo, a pesar de que, en los obesos y en los diabéticos tipo 2 de este trabajo, se ha detectado un valor inicial menor de lo normal en la síntesis de glucógeno, otros investigadores no pudieron detectar diferencias en células musculares procedentes de sujetos con distintos grados de sensibilidad a la insulina (Jackson, Bagstaff y col. 2000; Krutzfeldt, Kausch y col. 2000).

El valor basal de la actividad glucógeno sintasa a y síntesis de glucógeno en los pacientes obesos y en los diabéticos tipo 2, menor respecto al sujeto normal, indica un cierto deterioro del metabolismo de la glucosa en el tejido de estos pacientes. De hecho, en la fisiopatología de la obesidad, como en la de la diabetes tipo 2, uno de los efectos mejor descritos es el de la acción de la insulina sobre un metabolismo del glucógeno, reducido en el músculo esquelético (Damsbo, Vaag y col. 1991; Beck-Nielsen y Groop 1994); en concreto, trabajos realizados en músculo procedente de estos mismos pacientes han documentado que una disminución en la acción de la hormona altera el

transporte de glucosa, la actividad glucógeno sintasa α y la síntesis de glucógeno (Damsbo, Vaag y col. 1991; Beck-Nielsen y Groop 1994; Smith 2002).

Lo observado en este estudio, sobre la actividad glucógeno sintasa α y síntesis de glucógeno en el músculo del obeso y del diabético, concuerda con otras realizadas en el músculo esquelético de modelos experimentales de rata y ratón con distintos estadios de alteración en el metabolismo de la glucosa –resistencia a insulina, obesidad y diabetes– (Ciaraldi, Nikoulina y col. 2007; Dokken, Sloniger y col. 2005; Eldar-Finkelman, Schreyer y col. 1999; MacAulay, Blair y col. 2005; Nikoulina, Ciaraldi y col. 2000). Específicamente, en esas circunstancias metabólicas, la actividad glucógeno sintasa quinasa 3 –GSK-3– está hiperactivada, lo cual conlleva una disminución de la actividad glucógeno sintasa y de la síntesis de glucógeno (Ciaraldi, Nikoulina y col. 2007; Dokken, Sloniger y col. 2005; Eldar-Finkelman, Schreyer y col. 1999; MacAulay, Blair y col. 2005; Nikoulina, Ciaraldi y col. 2000); además, en el músculo esquelético de conejo, se documentó que tanto las MAPKs como la p70s6K eran capaces de inactivar a GSK-3 (Sutherland y Cohen 1994). Asimismo, en una línea celular de fibroblastos de ratón –NIH-3T3–, se observó que la p90 RSK también reduce la actividad GSK-3 (Eldar-Finkelman, Seger y col. 1995). En relación con lo anterior, y de acuerdo con los resultados aquí expuestos, puede afirmarse que el BRS-3-AP incrementa la actividad de las enzimas PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1, lo que conduciría a una reducción en la actividad GSK-3 que, a su vez, daría lugar al aumento en la de glucógeno sintasa α y, en consecuencia, a la de síntesis de glucógeno observada en este trabajo.

Los estudios publicados, en los que se relaciona el BRS-3 con el metabolismo, son escasos; sin embargo, trabajos realizados en ratones han informado de que la inhibición del gen de este receptor produce alteraciones, como es la de una reducción en la tasa metabólica, un incremento en la ingestión de alimentos, un aumento de la concentración de leptina circulante, hiperfagia celular y niveles altos de insulina en sangre (Ohki-Hamazaki, Wada y col. 1997; Matsumoto, Yamada y col. 2003). En otro estudio, en el que también se utilizaron ratones que no expresan el BRS-3, se observó, en el adipocito, un mecanismo de translocación del Glut-4 alterado, y se documentó que las células β conservan tanto la respuesta de la insulina a la glucosa, como el proceso de biosíntesis de la hormona; no obstante, en estos ratones, el crecimiento del islote pancreático fue inferior a lo normal (Nakamichi, Wada y col. 2004).

Los resultados aquí incluidos muestran que el valor máximo obtenido con BRS-3-AP –que se consigue a una concentración variable en función del grupo estudiado–, en cada uno de los parámetros analizados es, en general, similar al detectado con insulina, lo cual refuerza la idea de acciones comunes entre ambos. Asimismo, la acción de este agonista del BRS-3 es común a la descrita por otros investigadores con relación a otras hormonas, péptidos insulinomiméticos, y agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas (González, Sancho y col. 2005; Luque, González y col. 2002; González, Acitores y col. 2005; Moreno, Nuche-Berenguer y col. 2011; Pulido, Romero y col. 1996; Redondo, Trigo y col. 2003; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001; Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011). De hecho, se ha informado que la insulina, el GLP-1, la Ex-4 y la Ex-9 intervienen en el aumento no solo de la actividad de la PI3K/PKB, p70s6K y MAPKs, sino que también incrementan el transporte de glucosa, resultando tener, incluso, una acción normalizadora. Además, esas hormonas y péptidos aumentan el nivel de ARNm y el valor de la proteína Glut-4, y estimulan la actividad glucógeno sintasa α y la síntesis de glucógeno (González, Sancho y col. 2005; Luque, González y col. 2002; González, Acitores y col. 2005; Moreno, Nuche-Berenguer y col. 2011; Redondo, Trigo y col. 2003; Villanueva-Peñacarrillo, Puente y col. 2001; Villanueva-Penacarrillo, Martin-Duce y col. 2011); y en un trabajo realizado en el músculo esquelético de la rata, se ha documentado que las sulfonilureas estimulan el transporte de glucosa, y que ello es debido a un aumento en la translocación del Glut-4 a la membrana plasmática (Pulido, Romero y col. 1996).

El efecto insulinomimético del BRS-3-AP, mostrado en este trabajo, a pesar de tener una alta afinidad por el BRS-3, podría ser cuestionado, debido a su baja selectividad, pues también se une a los receptores GRPR y a los NMBR (Mantey, Weber y col. 1997; Pradhan, Katsuno y col. 1998; Mantey, Coy y col. 2001; Reubi, Wenger y col. 2002). Es por ello que, en un intento por determinar si el ligando BRS-3-AP es exclusivo del receptor BRS-3, este se silenció, en miotúbulos normales para, a continuación, ser incubados con BRS-3-AP; además, células de sujeto normal fueron tratadas con BRS-3-AP y ME, de forma independiente y simultánea (Ryan, Weber y col. 1998a). Los resultados aquí mostrados documentan que la presencia conjunta del BRS-3-AP y del ME estimulan, como era de esperar, el transporte de glucosa en células de sujeto normal, y en la misma magnitud que aquellas estimuladas solo con el ligando; sin embargo, los miotúbulos, a los que previamente se había silenciado el gen, no responden al BRS-3-AP. Con ello, se

confirma que toda la información aportada en el presente estudio es única y exclusivamente consecuencia de la unión del BRS-3-AP con el receptor BRS-3.

Lo anterior concuerda con resultados previos de Ryan y col. (1998), que consiguieron inhibir, en más de un 90 %, la actividad de los receptores GRPR, mediante la utilización del péptido ME a la concentración de 100 nM, demostrando así que la activación del BRS-3 se debía a su unión con BRS-3-AP (Ryan, Weber y col. 1998a); además, observaron que ello produce un aumento en la actividad fosfolipasa C y D, lo cual genera inosítoles fosfatos, movilización de calcio intracelular, aumento en el metabolismo celular pero no en su crecimiento y, por último, un incremento en la actividad de la proteína de adhesión p125^{FAK}, todo ello independientemente de la actividad de la adenilato ciclasa (Ryan, Weber y col. 1998a; Ryan, Weber y col. 1998b).

A lo largo de este trabajo se ha mencionado, reiteradamente, el hecho de que los pacientes obesos, y aún más los diabéticos tipo 2, tienen una sensibilidad mayor al BRS-3-AP que los sujetos normales. Sin embargo, no existe, hasta la fecha, ningún estudio comparativo que informe sobre los efectos de este ligando sintético, o de cualquier otro relativo al BRS-3, entre sujetos normales, pacientes obesos y diabéticos tipo 2. Por ello, y debido a su importancia, es necesario seguir incidiendo en este aspecto, cuyo resultado ayudaría a un mayor conocimiento, no solo del receptor sino de las acciones de este u otros posibles ligandos, por el beneficio sanitario que puede tener debido a su potencial terapéutico.

CONCLUSIONES

1. El Receptor Bombesina Subtipo 3 está expresado en el músculo esquelético, tejido esencial en el metabolismo de la glucosa, característica que conservan sus células aisladas y diferenciadas. Además, el nivel de ARNm y el de proteína del BRS-3, ambos están disminuidos respecto al sujeto normal, en el miotúbulo del paciente obeso, y su expresión –ARNm y proteína– es aún menor en el del paciente diabético tipo 2, estableciéndose así un vínculo entre la expresión deficiente del receptor y el desarrollo de ambas patologías.
2. El BRS-3, en los miotúbulos de los tres grupos estudiados, no solo es funcional sino que, además, el ligando sintético BRS-3-AP, al igual que la insulina, incrementa la expresión del propio receptor –ARNm y proteína– y la del Glut-4, el transporte de glucosa, parámetros relacionados con el metabolismo del azúcar, y la actividad de quinasas de señalización intracelular.
3. La acción estimuladora del BRS-3-AP sobre el transporte de glucosa, depende de un incremento en la actividad del sistema PI3K/PKB y también de la p42/p44 MAPK.
4. Los miotúbulos de pacientes obesos desarrollan una sensibilidad, mayor de lo normal, al BRS-3-AP, que es aún más acusada en aquellos con diabetes tipo 2. Además, el BRS-3-AP, en el paciente obeso y en el diabético tipo 2, tiene un efecto tendente hacia la normalización de parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa.
5. Los efectos producidos por el BRS-3-AP se deben a su unión, única y exclusiva, con el BRS-3.

Los resultados de este trabajo apoyan la propuesta de que el Receptor Bombesina Subtipo 3 y/o su ligando sintético, podrían ser utilizados como posible diana/agente terapéutico en el tratamiento de situaciones fisiopatológicas que cursan con un metabolismo de la glucosa alterado.

BIBLIOGRAFÍA

- Acitores A, González N, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2004). "Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle." *J Endocrinol.* 180(3):389-98.
- Acitores A, González N, Sancho V, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2005). "Participation of protein kinases in the stimulant action of GLP-1 on 2-deoxy-D-glucose uptake by normal rat skeletal muscle." *Horm Metab Res.* 37(5):275-80.
- Alegría Ezquerro E, Castellano Vázquez JM, Alegría Barrero A. (2008). "[Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy]." *Rev Esp Cardiol.* 61(7):752-64.
- Arnés L, González N, Tornero-Esteban P, Sancho V, Acitores A, Valverde I, Delgado E, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2008). "Characteristics of GLP-1 and exendins action upon glucose transport and metabolism in type 2 diabetic rat skeletal muscle." *Int J Mol Med.* 22(1):127-32.
- Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2009). "Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parameters in rat liver and muscle, in normal and type 2 diabetic state." *Regul Pept.* 153(1-3):88-92.
- Arnold TP, Standaert ML, Hernandez H, Watson J, Mischak H, Kazanietz MG, Zhao L, Cooper DR, Farese RV. (1993). "Effects of insulin and phorbol esters on MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) phosphorylation (and other parameters of protein kinase C activation) in rat adipocytes, rat soleus muscle and BC3H-1 myocytes." *Biochem J* 295 (Pt 1): 155-64.
- Baldwin SA. (1993). "Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins." *Biochim Biophys Acta.* J;1154(1):17-49.
- Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen E. (1992). "The insulin receptor activation process involves localized conformational changes." *J Biol Chem* 267: 23290-4.
- Batthey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slaterry T, Mann E, Feldman RI. (1991). "Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2): 395-9.
- Beck-Nielsen H, Groop LC. (1994). "Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* 94(5): 1714-21.
- Benya RV, Kusui T, Pradhan TK, Batthey JF, Jensen RT. (1995). "Expression and characterization of cloned human bombesin receptors." *Mol Pharmacol* 47(1): 10-20.
- Blau HM, Webster C. (1981). "Isolation and characterization of human muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5623-7.
- Boyle RG, Humphries J, Mitchell T, Showell GA, Apaya R, Iijima H, Shimada H, Arai T, Ueno H, Usui Y, Sakaki T, Wada E, Wada K. (2005). "The design of a new potent and selective ligand for the orphan bombesin receptor subtype 3 (BRS3)." *J Pept Sci* 11(3): 136-41.
- Bradford MM. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brown GK. (2000). "Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency." *J Inherit Metab Dis* 23(3): 237-46.

- Burgering BM, Medema RH, Maassen JA, van de Wetering ML, van der Eb AJ, McCormick F, Bos JL. (1991). "Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation." *EMBO J* 10(5): 1103-9.
- Carel JC, Le Stunff C, Condamine L, Mallet E, Chaussain JL, Adnot P, Garabédian M, Bougnères P. (1999). "Resistance to the lipolytic action of epinephrine: a new feature of protein Gs deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 4127-31.
- Cheatham B, Kahn CR. (1995). "Insulin action and the insulin signaling network." *Endocr Rev* 16(2): 117-42.
- Ciaraldi TP, Abrams L, Nikoulina S, Mudaliar S, Henry RR. (1995). "Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects." *J Clin Invest* 96(6): 2820-7.
- Ciaraldi TP, Nikoulina SE, Bandukwala RA, Carter L, Henry RR. (2007). "Role of glycogen synthase kinase-3 alpha in insulin action in cultured human skeletal muscle cells." *Endocrinology* 148(9): 4393-9.
- Cushman SW, Wardzala LJ. (1980). "Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane." *J Biol Chem* 255(10): 4758-62.
- Czech MP. (1985). "The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function." *Annu Rev Physiol* 47: 357-81.
- Czech MP, Corvera S. (1999). "Signaling mechanisms that regulate glucose transport." *J Biol Chem* 274(4): 1865-8.
- Daaka Y. (2004). "G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm." *Sci STKE* 2004(216): re2.
- Damsbo P, Vaag A, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. (1991). "Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus." *Diabetologia* 34(4): 239-45.
- De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. (1998). "Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12202-7.
- Després JP, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ. (1996). "Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease." *N Engl J Med* 334(15): 952-7.
- Dokken BB, Sloniger JA, Henriksen EJ. (2005). "Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(6): E1188-94.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiaz F, Kan YW, Goldfine ID., Roth RA, Rutter WJ. (1985). "The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling." *Cell* 40(4): 747-58.
- Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, LeBoeuf RC, Krebs EG. (1999). "Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes and obesity-prone C57BL/6J mice." *Diabetes* 48(8): 1662-6.
- Eldar-Finkelman H, Seger R, Vandenheede JR, Krebs EG. (1995). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells." *J Biol Chem* 270(3): 987-90.
- Erspamer V, Erpamer GF, Inselvini M. (1970). "Some pharmacological actions of alytesin and bombesin." *J Pharm Pharmacol* 22(11): 875-6.

- Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA, Battey JF. (1993). "BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells." *J Biol Chem* 268(8): 5979-84.
- Feng Y, Guan XM, Li J, Metzger JM, Zhu Y, Juhl K, Zhang BB, Thornberry NA, Reitman ML, Zhou YP. (2011). "Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets across multiple species." *Endocrinology* 152(11): 4106-15.
- Filipek S, Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K. (2003). "G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus." *Annu Rev Physiol* 65: 851-79.
- Fleig WE, Noether-Fleig G, Fussgaenger R, Ditschuneit H. (1984). "Modulation by a sulfonylurea of insulin-dependent glycogenesis, but not of insulin binding, in cultured rat hepatocytes. ." *Diabetes* 33: 285-290.
- Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, Di Leone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. (2005). "Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism." *Curr Neurovasc Res.* 5(2): 99-105.
- Frevert EU, Kahn BB. (1997). "Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Cell Biol* 17(1): 190-8.
- Frucht H, Gazdar AF, Park JA, Oie H, Jensen RT. (1992). "Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells." *Cancer Res* 52(5): 1114-22.
- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S. (1989). "Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues." *J Biol Chem* 264(14): 7776-9.
- Gerhardt (1983). "Creatine kinase.": *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer HU (ed.). Academic Press, New York: 508-518.
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD. (1979). "Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1): 106-10.
- Goldstein BJ. (2003). "Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus." *Rev. Cardiovasc Med* 4: S3-S10
- González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2005). "Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes." *Regul Pept* 126(3): 203-11.
- González N, Hocart SJ, Portal-Núñez S, Mantey SA, Nakagawa T, Zudaire E, Coy DH, Jensen RT. (2008). "Molecular basis for agonist selectivity and activation of the orphan bombesin receptor subtype 3 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 324(2): 463-74.
- González N, Sancho V, Martín-Duce A, Tornero-Esteban P, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2005). "GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients." *Int J Mol Med* 16(4): 747-52.
- Goodyear LJ, Hirshman MF, Napoli R, Calles J, Markuns JF, Ljungqvist O, Horton ES. (1996). "Glucose ingestion causes GLUT4 translocation in human skeletal muscle." *Diabetes* 45(8): 1051-6.
- Gorbulev V, Akhundova A, Büchner H, Fahrenholz F. (1992). "Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy." *Eur J Biochem* 208(2): 405-10.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." *Circulation* 109(3): 433-8.

Guan XM, Chen H, Dobbelaar PH, Dong Y, Fong TM, Gagen K, Gorski J, He S, Howard AD, Jian T, Jiang M, Kan Y, Kelly TM, Kosinski J, Lin LS, Liu J, Marsh DJ, Metzger JM, Miller R, Nargund RP, Palyha O, Shearman L, Shen Z, Stearns R, Strack AM, Stribling S, Tang YS, Wang SP, White A, Yu H, Reitman ML. (2010). "Regulation of energy homeostasis by bombesin receptor subtype-3: selective receptor agonists for the treatment of obesity." *Cell Metab* 11(2): 101-12.

Guan XM, Metzger JM, Yang L, Raustad KA, Wang SP, Spann SK, Kosinski JA, Yu H, Shearman LP, Faidley TD, Palyha O, Kan Y, Kelly TM, Sebhat I, Lin LS, Dragovic J, Lyons KA, Craw S, Nargund RP, Marsh DJ, Strack AM, Reitman ML. (2011). "Antiobesity effect of MK-5046, a novel bombesin receptor subtype-3 agonist." *J Pharmacol Exp Ther* 336(2): 356-64.

Guma A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A. (1991). "Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle." *Am J Physiol* 268: E613-22.

Hamm HE. (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* 273(2): 669-72.

Harris RA, Crabb DW. (1997). "Metabolic interrelationships" *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4^o ed. (Devlin, T. M., ed.) New York, John Wiley & Sons, Inc. pp. 525-562.

Hazell GG, Hindmarch CC, Pope GR, Roper JA, Lightman SL, Murphy D, O'Carroll AM, Lolait SJ. (2012). "G protein-coupled receptors in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei--serpentine gateways to neuroendocrine homeostasis." *Front Neuroendocrinol.* 33(1): 45-66.

He J, Gurunathan S, Iwasaki A, Ash-Shaheed B, Kelsall BL. (2000). "Primary role for Gi protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses." *J Exp Med* 191(9): 1605-10.

Helmreich EJ, Hofmann KP. (1996). "Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer." *Biochim Biophys Acta* 1286(3): 285-322.

Henry RR, Abrams L, Nikoulina S, Ciaraldi TP. (1995). "Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. ." *Diabetes* 44: 936-946.

Henry RR, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Abrams L, Nikoulina SE. (1996). "Acquired defects of glycogen synthase activity in cultured human skeletal muscle cells: influence of high glucose and insulin levels." *Diabetes* 45(4): 400-7.

Herrera R, Rosen OM. (1986). "Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation." *J Biol Chem* 261(26): 11980-5.

Hidaka H, Howard BV, Ishibashi F, Kosmakos FC, Craig JW, Bennett PH, Lerner J. (1981). "Effect of pH and 3-hydroxybutyrate on insulin binding and action in cultured human fibroblasts." *Diabetes* 30(5): 402-6.

Hotta K, Matsukawa Y, Nishida M, Kotani K, Takahashi M, Kuriyama H, Nakamura T, Wada K, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2000). "Mutation in bombesin receptor subtype-3 gene is not a major cause of obesity in the Japanese." *Horm Metab Res* 32(1): 33-4.

Hou X, Wei L, Harada A, Tatamoto K. (2006). "Activation of bombesin receptor subtype-3 stimulates adhesion of lung cancer cells." *Lung Cancer* 54: 143-148.

Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meidl P, Ouverdin B, Parker A, Prlic A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A, Birney E. (2007). "Ensembl 2007." *Nucleic Acids Res.* 35: D610-7.

Hue L, Bontemps F, Hers HG. (1975). "The effect of glucose and of potassium ions on the interconversion of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparation." *Biochem Biophys Res Commun* 152: 105-114.

Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T. (2008). "Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled receptors: potential utility in treatment of diabetes and heart disease." *Pharmacol Ther* 119(3): 291-310.

Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shiotani H, Terajima S, Nakamura Y, Mori K, Yoshida M, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M. (2012). "Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors." *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 177.

Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM. (2003). "Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin." *Mol Cell Biol* 23(14): 4892-900.

Inoue S. (1990). "Metabolic effect of autonomic nervous activity in development of obesity (ventromedial obesity)." *Progress in Obesity Research*. Oomura Y (ed.) John Libbey, London: 95-101

Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcusohn J, Klip A, Skolnik EY. (1995). "The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10247-51.

Ishola TA, Kang J, Qiao J, Evers BM, Chung DH. (2007). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells." *Biochim Biophys Acta.* 1770: 927-32.

Jackson S, Bagstaff SM, Lynn S, Yeaman SJ, Turnbull DM, Walker M. (2000). "Decreased insulin responsiveness of glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells from insulin-resistant nondiabetic relatives of type 2 diabetic families." *Diabetes* 49(7): 1169-77.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. (2008). "International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states." *Pharmacol Rev* 60(1): 1-42.

Kahn BB. (1996). "Glucose transport: pivotal step in insulin action." *Diabetes* 45: 1644-54.

Kahn SE. (2003). "The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes." *Diabetologia* 46(1): 3-19.

Kandror KV, Pilch PF. (1996). "Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells." *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): E1-14.

Karlsson HK, Chibalin AV, Koistinen HA, Yang J, Koumanov F, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR, Holman GD. (2009). "Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle." *Diabetes* 58(4): 847-54.

- Katsoyannis PG, Tometsko A, Fukuda K. (1963). "Insulin peptides IX: the synthesis of the A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. ." *J Am Chem Soc* 85: 2863-70.
- Klip A, Ramlal T, Walker D. (1986). "Insulin stimulation of glucose uptake and the transmembrane potential of muscle cells in culture." *FEBS Lett* 205(1): 11-4.
- Krützfeldt J, Kausch C, Volk A, Klein HH, Rett K, Häring HU, Stumvoll M. (2000). "Insulin signaling and action in cultured skeletal muscle cells from lean healthy humans with high and low insulin sensitivity." *Diabetes* 49(6): 992-8.
- Laemli UK. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. (1993). "Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians." *N Engl J Med* 329(27): 1988-92.
- Litherland GJ, Hajdуч E, Hundal HS. (2001). "Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review)." *Mol Membr Biol* 18(3): 195-204.
- Liu HJ, Tan YR, Li ML, Liu C, Xiang Y, Qin XQ. (2011). "Cloning of a novel protein interacting with BRS-3 and its effects in wound repair of bronchial epithelial cells." *PLoS One* 6(8): e23072.
- Liu J, Lao ZJ, Zhang J, Schaeffer MT, Jiang MM, Guan XM, Van der Ploeg LH, Fong TM. (2002). "Molecular basis of the pharmacological difference between rat and human bombesin receptor subtype-3 (BRS-3)." *Biochemistry*. 41: 8954-60.
- López-Delgado MI, Morales M, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I. (1998). "Effects of glucagon-like peptide 1 on the kinetics of glycogen synthase a in hepatocytes from normal and diabetic rats." *Endocrinology* 139(6): 2811-7.
- Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. (1995). "Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. ." *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5817-21.
- Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2002). "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes." *J Endocrinol* 173(3): 465-73.
- MacAulay K, Blair AS, Hajdуч E, Terashima T, Baba O, Sutherland C, Hundal HS. (2005). "Constitutive activation of GSK3 down-regulates glycogen synthase abundance and glycogen deposition in rat skeletal muscle cells." *J Biol Chem* 280(10): 9509-18.
- Maekawa F, Quah HM, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H. (2004). "Leptin resistance and enhancement of feeding facilitation by melanin-concentrating hormone in mice lacking bombesin receptor subtype-3." *Diabetes* 53: 570-576.
- Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, Nguyen NT, Li Z, Mojica WA, Hilton L, Rhodes S, Morton SC, Shekelle PG. (2005). "Meta-analysis: surgical treatment of obesity." *Ann Intern Med* 142(7): 547-59.
- Malbon CC. (2004). "Insulin signalling: putting the 'G-' in protein-protein interactions." *Biochem J* 380(Pt 3): e11-2.
- Mantey SA, Coy DH, Pradhan TK, Igarashi H, Rizo IM, Shen L, Hou W, Hocart SJ, Jensen RT. (2001). "Rational design of a peptide agonist that interacts selectively with the orphan receptor, bombesin receptor subtype 3." *J Biol Chem* 276(12): 9219-29.
- Mantey SA, Weber HC, Sainz E, Akesson M, Ryan RR, Pradhan TK, Searles RP, Spindel ER, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1997). "Discovery of a high affinity radioligand for the human

orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors." *J Biol Chem* 272(41): 26062-71.

Marger MD, Saier MH. Jr. (1993). "A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport." *Trends Biochem Sci* 18(1): 13-20.

Matsumoto K, Yamada K, Wada E, Hasegawa T, Usui Y, Wada K. (2003). "Bombesin receptor subtype-3 modulates plasma insulin concentration." *Peptides* 24: 83-90.

Maudsley S, Martin B, Egan JM. (2011). "To be or not to be obese." *Endocrinology* 152(10): 3592-6.

Mayor P, Maianu L, Garvey WT. (1992). "Glucose and insulin chronically regulate insulin action via different mechanisms in BC3H1 myocytes. Effects on glucose transporter gene expression." *Diabetes* 41: 274-285.

McDonald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. (1979). "Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue." *Biochem Biophys Res Commun*. 90(1): 227-33.

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. (1983). "Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord." *Biochem Biophys Res Commun* 114(2): 541-8.

Moody TW, Merali Z. (2004). "Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications." *Peptides* 25(3): 511-20.

Moody TW, Staley J, Zia F, Coy DH, Jensen RT. (1992). "Neuromedin B binds with high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates the growth of small-cell lung cancer cell lines." *J Pharmacol Exp Ther* 263(1): 311-7.

Moreno P, Nuche-Berenguer B, Gutiérrez-Rojas I, Acitores A, Sancho V, Valverde I, González N, Villanueva-Peñacarrillo ML (2011). "Normalizing action of exendin-4 and GLP-1 in the glucose metabolism of extrapancreatic tissues in insulin-resistant and type 2 diabetic states." *Journal of Molecular Endocrinology* 48, 37–47.

Moreno-Villegas Z, Ramos-Álvarez I, Sanz R, Jensen RT, González N (2012). "Role of bombesin receptor subtype-3 and its agonist [D-Phe⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesin₆₋₁₄ in lipid metabolism." 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Berlin, Alemania, 1-5 octubre, 2012. Póster discusión *Diabetologia* 55(Supp.1): S1-S538, 634, 2012.

Nakamichi Y, Wada E, Aoki K, Ohara-Imaizumi M, Kikuta T, Nishiwaki C, Matsushima S, Watanabe T, Wada K, Nagamatsu S. (2004). "Functions of pancreatic beta cells and adipocytes in bombesin receptor subtype-3-deficient mice." *Biochem Biophys Res Commun* 318(3): 698-703.

Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Mohideen P, Carter L, Henry RR. (2000). "Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes." *Diabetes* 49(2): 263-71.

Noria SF, Grantcharov T. (2013). "Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities." *Can J Surg* 56(1): 47-57.

Ohki-Hamazaki H, Wada E, Matsui K, Wada K. (1997). "Cloning and expression of the neuromedin B receptor and the third subtype of bombesin receptor genes in the mouse." *Brain Res* 762(1-2): 165-72.

Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, Maeno H, Imaki J, Kikuyama S, Wada E, Wada K. (1997). "Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity." *Nature* 390(6656): 165-9.

- Pandini G, Medico E, Conte E, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. (2003). "Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A." *J Biol Chem* 278(43): 42178-89.
- Polednak AP. (2003). "Trends in incidence rates for obesity-associated cancers in the US." *Cancer Detect Prev* 27(6): 415-21.
- Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, Donohue PJ, Weber HC, Sainz E, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1998). "Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* 343(2-3): 275-87.
- Pu J, Peng G, Li L, Na H, Liu Y, Liu P. (2011). "Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells." *J Lipid Res* 52(7): 1319-27.
- Pulido N, Romero R, Suárez AI, Rodríguez E, Casanova B, Rovira A (1996). "Sulfonylureas stimulate glucose uptake through GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 499-504.
- Qiao J, Kang J, Ishola TA, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. (2008). "Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 12891-6.
- Qin X, Qu X, Coy D, Weber HC. (2012). "A selective human bombesin receptor subtype-3 peptide agonist mediates CREB phosphorylation and transactivation." *J Mol Neurosci*. 46(1): 88-99.
- Ryan RR, Weber HC, Hou W, Sainz E, Mantey SA, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1998a). "Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3." *J Biol Chem*. 273(22):13613-24.
- Ryan RR, Weber HC, Mantey SA, Hou W, Hilburger ME, Pradhan TK, Coy DH, Jensen RT. (1998b). "Pharmacology and intracellular signaling mechanisms of the native human orphan receptor BRS-3 in lung cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther*. 287(1):366-80.
- Redondo A, Trigo MV, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2003). "Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver." *Mol Cell Endocrinol* 204(1-2): 43-50.
- Reitman ML, Dishy V, Moreau A, Denney WS, Liu C, Kraft WK, Mejia AV, Matson MA, Stoch SA, Wagner JA, Lai E. (2012). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-5046, a bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonist, in healthy patients." *J Clin Pharmacol* 52(9): 1306-16.
- Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M. (2002). "Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14)." *Clin Cancer Res* 8(4): 1139-46.
- Ronnett GV, Moon C. (2002). "G proteins and olfactory signal transduction." *Annu Rev Physiol* 64: 189-222.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurler ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramser J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Ainscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnin D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccociola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Cobley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, Delgado O, Deshazo D, Dhami P, Ding Y, Dinh H, Dodsworth S, Draper H, Dugan-

Rocha S, Dunham A, Dunn M, Durbin KJ, Dutta I, Eades T, Ellwood M, Emery-Cohen A, Errington H, Evans KL, Faulkner L, Francis F, Frankland J, Fraser AE, Galgoczy P, Gilbert J, Gill R, Glockner G, Gregory SG, Gribble S, Griffiths C, Grocock R, Gu Y, Gwilliam R, Hamilton C, Hart EA, Hawes A, Heath PD, Heitmann K, Hennig S, Hernandez J, Hinzmann B, Ho S, Hoffs M, Howden PJ, Huckle EJ, Hume J, Hunt PJ, Hunt AR, Isherwood J, Jacob L, Johnson D, Jones S, de Jong PJ, Joseph SS, Keenan S, Kelly S, Kershaw JK, Khan Z, Kioschis P, Klages S, Knights AJ, Kosiura A, Kovar-Smith C, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leversha M, Lewis L, Liu W, Lloyd C, Lloyd DM, Louseged H, Loveland JE, Lovell JD, Lozado R, Lu J, Lyne R, Ma J, Maheshwari M, Matthews LH, McDowall J, McLaren S, McMurray A, Meidl P, Meitinger T, Milne S, Miner G, Mistry SL, Morgan M, Morris S, Muller I, Mullikin JC, Nguyen N, Nordsiek G, Nyakatura G, O'Dell CN, Okwuonu G, Palmer S, Pandian R, Parker D, Parrish J, Pasternak S, Patel D, Pearce AV, Pearson DM, Pelan SE, Perez L, Porter KM, Ramsey Y, Reichwald K, Rhodes S, Ridler KA, Schlessinger D, Schueler MG, Sehra HK, Shaw-Smith C, Shen H, Sheridan EM, Shownkeen R, Skuce CD, Smith ML, Sotheran EC, Steingruber HE, Steward CA, Storey R, Swann RM, Swarbreck D, Tabor PE, Taudien S, Taylor T, Teague B, Thomas K, Thorpe A, Timms K, Tracey A, Trevanion S, Tromans AC, d'Urso M, Verduzco D, Villasana D, Waldron L, Wall M, Wang Q, Warren J, Warry GL, Wei X, West A, Whitehead SL, Whiteley MN, Wilkinson JE, Willey DL, Williams G, Williams L, Williamson A, Williamson H, Wilming L, Woodmansey RL, Wray PW, Yen J, Zhang J, Zhou J, Zoghbi H, Zorilla S, Buck D, Reinhardt R, Poustka A, Rosenthal A, Lehrach H, Meindl A, Minx PJ, Hillier LW, Willard HF, Wilson RK, Waterston RH, Rice CM, Vaudin M, Coulson A, Nelson DL, Weinstock G, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Gibbs RA, Beck S, Rogers J, Bentley DR: The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434:325-337 Roy, D., Jóhannsson, E., Bonen, A. y Marette, A. (1997). "Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. ." *Am J Physiol* 273: E688-94

Roy D, Johannsson E, Bonen A, Marette A (1997) Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273: E688-94.

Ryan RR, Weber HC, Hou W, Sainz E, Mantey SA, Battey JF, Coy DH, Jensen RT. (1998a). "Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3." *J Biol Chem* 273(22): 13613-24.

Ryan RR, Weber HC, Mantey SA, Hou W, Hilburger ME, Pradhan TK, Coy DH, Jensen RT. (1998b). "Pharmacology and intracellular signaling mechanisms of the native human orphan receptor BRS-3 in lung cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* 287(1): 366-80.

Salon JA, Lodowski DT, Palczewski K. (2011) "The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery." *Pharmacol Rev* 63(4): 901-37.

Sancho V, Trigo MV, Martín-Duce A, González N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2006). "Effect of GLP-1 on D-glucose transport, lipolysis and lipogenesis in adipocytes of obese subjects." *Int J Mol Med*.17(6):1133-7.

Sanger F. (1959). "Chemistry of insulin." *Science* 29: 1340-4.

Sano H, Feighner SD, Hreniuk DL, Iwaasa H, Sailer AW, Pan J, Reitman ML, Kanatani A, Howard AD, Tan CP. (2004). "Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates." *Genomics* 84(1): 139-46.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. (1998). "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling." *Biochem J* 333 (Pt 3): 471-90.

Smith SR. (1996). "The endocrinology of obesity." *Endocrinol Metab Clin North Am* 25(4): 921-42.

Smith U. (2002). "Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance is insulin resistance initiated in the adipose tissue?" *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(7): 897-904.

- Song T, Sugimoto K, Ihara H, Mizutani A, Hatano N, Kume K, Kambe T, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. (2007). "p90 RSK-1 associates with and inhibits neuronal nitric oxide synthase." *Biochem J* 401(2): 391-8.
- Song X, Zheng X, Malbon CC, Wang, H. (2001). "Galpha i2 enhances in vivo activation of and insulin signaling to GLUT4." *J Biol Chem* 276(37): 34651-8.
- Spiegelman BM, Flier JS. (2001). "Obesity and the regulation of energy balance." *Cell* 104(4): 531-43.
- Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP. (1990). "Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor." *Mol Endocrinol* 4(12): 1956-63.
- Stuart CA, Wen G, Williamson ME, Jiang J, Gilkison CR, Blackwell SJ, Nagamani M, Ferrando AA. (2001). "Altered GLUT1 and GLUT3 gene expression and subcellular redistribution of GLUT4: protein in muscle from patients with acanthosis nigricans and severe insulin resistance." *Metabolism* 50(7): 771-7.
- Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A, Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, Hogenesch JB. (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4465-70.
- Sun B, Halmos G, Schally AV, Wang X, Martinez M. (2000). "Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers." *Prostate* 42: 295-303.
- Sun B, Schally AV, Halmos G. (2000). "The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers." *Regul Pept* 90: 77-84.
- Sutherland C, Cohen P. (1994). "The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro." *FEBS Lett* 338(1): 37-42.
- Suzuki K, Kono T. (1993). "Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site." *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2452-5
- Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A, Halmos G. (2005). "Inhibition of growth of experimental human and hamster pancreatic cancers in vivo by a targeted cytotoxic bombesin analog." *Pancreas* 31(3): 275-82.
- Taha C, Klip A. (1999). "The insulin signaling pathway." *J Membr Biol* 169(1): 1-12.
- Tan YR, Qi MM, Qin XQ, Xiang Y, Li X, Wang Y, Qu F, Liu HJ, Zhang JS. (2006). "Wound repair and proliferation of bronchial epithelial cells enhanced by bombesin receptor subtype 3 activation." *Peptides*. 27(7):1852-8.
- Tan YR, Qin XQ, Xiang Y, Yang T, Qu F, Wang Y, Liu HJ, Weber HC. (2007). "PPARalpha and AP-2alpha regulate bombesin receptor subtype 3 expression in ozone-stressed bronchial epithelial cells." *Biochem J* 405(1): 131-7.
- Tanaka J, Nakagawa S, Kushiya E, Yamasaki M, Fukaya M, Iwanaga T, Simon MI, Sakimura K, Kano M, Watanabe M. (2000). "Gq protein alpha subunits Galphaq and Galpha11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells." *Eur J Neurosci* 12(3): 781-92.
- Turner NC, Clapham JC. (1998). "Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities." *Prog Drug Res* 51: 33-94.

- Uehara H, Hocart SJ, González N, Mantey SA, Nakagawa T, Katsuno T, Coy DH, Jensen RT. (2012). "The molecular basis for high affinity of a universal ligand for human bombesin receptor (BnR) family members." *Biochem Pharmacol* 84: 936-48.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, y col. (1985). "Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes." *Nature* 313(6005): 756-61.
- Van Epps-Fung M, Gupta K, Hardy RW, Wells A. (1997). "A role of phospholipase C activity in GLUT4-mediated glucose transport." *Endocrinology* 138: 5170-517.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Martín-Duce A, Ramos-Álvarez I, Gutiérrez-Rojas I, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Acitores A, Sancho V, Valverde I, González N. (2011). "Characteristic of GLP-1 effects on glucose metabolism in human skeletal muscle from obese patients." *Regul Pept* 168(1-3): 39-44.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I. (2001). "Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models". *Endocrine* 15: 241-248.
- Weber HC, Walters J, Leyton J, Casibang M, Purdom S, Jensen RT, Coy DH, Ellis C, Clark G, Moody TW. (2001). "A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells." *Eur J Pharmacol* 412(1): 13-20.
- Whitley JC, Moore C, Giraud AS, Shulkes A. (1999). "Molecular cloning, genomic organization and selective expression of bombesin receptor subtype 3 in the sheep hypothalamus and pituitary." *J Mol Endocrinol*. 23(1): 107-16.
- Wu JM, Nitecki DE, Biancalana S, Feldman RI. (1996). "Discovery of high affinity bombesin receptor subtype 3 agonists." *Mol Pharmacol* 50(5): 1355-63.
- Yamada K, Ohki-Hamazaki H, Wada K. (2000). "Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice." *Physiol Behav* 68(4): 555-61.
- Yamada K, Wada E, Imaki J, Ohki-Hamazaki H, Wada K. (1999). "Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3-deficient) mice." *Physiol Behav*. 66: 863:867.
- Zhang L, Nothacker HP, Wang Z, Bohn LM, Civelli O. (2009). "Pharmacological characterization of a selective agonist for bombesin receptor subtype-3." *Biochem Biophys Res Commun* 387(2): 283-8.
- Zhang L, Parks GS, Wang Z, Wang L, Lew M, Civelli O. (2013). "Anatomical characterization of bombesin receptor subtype-3 mRNA expression in the rodent central nervous system." *J Comp Neurol*. 521(5):1020-39
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF. (1989). "Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations." *J Biol Chem* 264(21): 12358-63.



Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes

Irene Ramos-Álvarez^{a,b}, Antonio Martín-Duce^c, Zaida Moreno-Villegas^a, Raúl Sanz^d, César Aparicio^e, Sergio Portal-Núñez^f, Samuel A. Mantey^g, Robert T. Jensen^g, Nieves González^{a,b,*}

^a Department of Metabolism, Nutrition and Hormones, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^b CIBERDEM, Madrid, Spain

^c Department of Surgery, Unit of Surgery, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^d Department of Neurology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^e Department of Vascular Surgery, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^f Department of Bone and Mineral Metabolism, IIS-Fundación Jiménez Díaz, RETICEF, Madrid, Spain

^g Digestive Diseases Branch, NIDDK, NIH, Bethesda, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2012

Received in revised form 3 December 2012

Accepted 26 December 2012

Available online xxx

Keywords:

BRS-3

Human-muscle

GLUT-4

Glucose-metabolism

Diabetes

Obesity

ABSTRACT

BRS-3 KO-mice developed obesity and unbalanced glucose metabolism, suggesting an important role of BRS-3 receptor in glucose homeostasis. We explored BRS-3 expression in skeletal muscle from normal, obese or type-2 diabetic (T2D) patients, and the effect of [D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{1–14}–BRS-3-agonist-peptide (BRS-3-AP) – on glucose-related effects, before or after BRS-3 gene silencing. In muscle tissue and primary cultured myocytes from altered metabolic states, BRS-3 gene/protein expressions were down-regulated. In normal, obese and T2D cells; A) BRS-3-AP as insulin enhanced BRS-3 and GLUT-4 mRNA/protein levels; improving glucotransporter translocation to plasma membrane, and B) BRS-3-AP caused a concentration-related-stimulation of glucose transport, being obese and T2D myocytes more sensitive to the ligand than normal. Wortmannin and PD98059, but not rapamycin, abolished the stimulatory action of BRS-3-AP on glucose transport. BRS-3 plays an important role in glucose metabolism, and could be used as a molecular target, and/or its ligand, as a therapeutic agent for obesity and diabetes treatments.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several studies have established that the disruption of the bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) results in metabolic alterations including obesity (Matsumoto et al., 2003; Ohki-Hamazaki et al., 1997).

BRS-3 shares a 51% and 47% amino acid homology with the human gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and neuromedin B receptor (NMBR) and it is classified in the bombesin receptor family (Fathi et al., 1993; Jensen et al., 2008). BRS-3 is an orphan G-protein coupled receptor, its natural ligand has not been described yet, and little is known about its pharmacology and function; the most noticeable expression in human takes place in brain and pancreatic islets (Feng et al., 2011; Jensen et al., 2008), and there are

also levels of its mRNA in skeletal muscle (Genecardss human-database [www.genecards.org]).

BRS-3-deficient mice developed obesity associated with hypertension and impairment of glucose metabolism; accompanied by a reduction of the metabolic rate, increment of the amount of food ingested and serum leptin (Ohki-Hamazaki et al., 1997). Moreover, knock-out mice showed higher serum insulin levels than normal (Matsumoto et al., 2003), and it has been reported that the unbalanced glucose metabolism observed, is mainly due to the impairment in the glucotransporter-4 (GLUT-4) translocation mechanism in the adipocyte (Nakamichi et al., 2004). These evidences support the idea that BRS-3 plays an important role in the mechanisms of energy balance and control of body weight (Guan et al., 2010).

The lack of a natural ligand contributes to the relative few studies related to BRS-3. In 1997 Mantey et al. described a synthetic compound, which consisted of a modified structure of that of bombesin – [D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{1–14}–, showed a very high affinity (K_i 4 nM) and potency to activate human BRS-3, but also for GRPR and NMBR (Mantey et al., 1997; Pradhan et al., 1998; Reubi et al., 2002). Recently, a novel selective BRS-3 agonist, MK-5046, increased metabolic rate and reduced body weight in

Abbreviations: BRS-3, bombesin receptor subtype-3; BRS-3-AP, bombesin receptor subtype-3 agonist peptide; AU, arbitrary units; IU, international units; N, normal subject; OB, obese patient; T2D, type 2 diabetic patient.

* Corresponding author. Address: Department of Metabolism, Nutrición y Hormonas, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 91 5440247.

E-mail address: ngonzalez@fjd.es (N. González).

0303-7207/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>

Please cite this article in press as: Ramos-Álvarez, I., et al. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>

rats but also increased heart rate, and blood pressure; although these latter effects were transient in nature, modest in magnitude and desensitized with continued dosing (Guan et al., 2011). However, in human studies, no changes were observed in heart rate, plasma glucose levels, or feelings of hunger/satiety using MK-5046 (Reitman et al., 2012). The compounds Bag-1 and Bag-2 are also described as BRS-3 agonists, and they also showed anti-obesity effects in mice by decreasing food intake (Guan et al., 2010).

There are a limited number of human BRS-3 studies (Hotta et al., 2000; Liu et al., 2011). In one recent work, evidence was provided for a potential role of BRS-3 in pancreatic islet physiology promoting glucose-stimulated insulin secretion (Feng et al., 2011), thus linking human metabolic assays *in vitro* and the function in human physiology.

The studies discussed above, strongly support that BRS-3 could be responsible for certain human alterations, related to glucose homeostasis (diabetes) and obesity. The present work attempts to address these issues, by systematically studying the specific role of BRS-3, in skeletal muscle from normal (N), obese (OB) or type 2 diabetic (T2D) patients, and also, to investigate the action of the [D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14}—synthetic BRS-3 agonist peptide (BRS-3-AP)—on glucose-related effects both, before and after BRS-3 gene silencing.

2. Material and methods

2.1. Reagents

[D-Phe⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesin_{6–14} (Bachem-AG, Bubendorf, Switzerland); pork-insulin (NovoBiolabs, Bagsvaerd, Denmark); [D-Phe⁶]Bn-(6–14)methyl ester (ME) was a gift of Dr. Robert T. Jensen (NIDDK, NIH, Bethesda, MD, USA); RNeasy-Fibrous-Tissue-Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA); HAMs-F-10, M-199 and DMEM (Biocrom KG, Berlin, Germany); EDTA, cytochalasin-B, anti-α-tubulin, primers, wortmannin and rapamycin (Sigma-Chemical, St Louis, MO, USA); 2-deoxy-D-[1,2-³H(N)]glucose (Hartmann-Analytic, Braunschweig, Germany); DMEM and M-199 (Gibco, Paisley, Scotland, UK); PD98059 and antiGLUT-4 (Calbiochem[®], La Jolla, CA, USA); UltimaGold scintillation liquid (Packard, Gröninger, The Netherlands); horseradish peroxidase-linked-donkey anti-rabbit immunoglobulin, horseradish peroxidase-linked-sheep anti-mouse immunoglobulin, rainbow-markers, ECL-Western-blotting-kit, Hyperfilm-ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK); Subcellular Protein Fractionation-kit and antiBRS-3 (Thermo-Scientific, Rockford, IL, USA); Taqman Universal PCR Master-Mix and high-capacity-cDNA reverse transcription-kit, siRNA-pool, RNeasy (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK) were obtained from the indicated sources. All other commonly used chemicals were from Sigma or Merck (Merck Pharma Química, S.A., Barcelona, Spain).

2.2. Biological material

Human skeletal muscle samples (Table 1), previously informed consent given, from normal subjects—without alteration of glucose

metabolism—, obese or type 2 diabetic patients, all undergoing surgery, for purpose not related to this work (thyroidectomy, bariatric or vascular surgery) were obtained. The study was approved by the Ethic Committee of the IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain, in accordance with *The Declaration of Helsinki*. Pieces were cleaned with HAMs F-10, dissected from connecting tissue, divided in aliquots of 120 mg and storage at -80°C for extraction of total RNA. Also, in aliquots of 400 mg, immediately, isolation of myoblasts, and posterior culture for growth and differentiation, were performed as previously described (Gonzalez et al., 2005a). Neither normal subjects nor obese patients were taking any drug. T2D diabetic patients received a daily dose of insulin (9 units Insulin Novo-rapid flexpen 100 IU/ml). In all cases, isolated myoblast grew during 6 weeks in 5.5 mM glucose and insulin-free media. No differences in growth ratio or morphology were observed.

2.3. siRNA

Primary cultured myocytes were maintained as previously described (Gonzalez et al., 2005a). The ON-TARGETplus siRNA pool (three duplexes) for human BRS-3 was delivered through RNAimax system following manufacturer's recommendation. The extent of gene expression downregulation by was confirmed by RT-PCR 48 h after siRNA transfection.

2.4. Isolation of total RNA and real time PCR

In pieces from human skeletal muscle and primary cultured human myocytes total RNA purification was performed using RNeasy-Fibrous-Tissue-kit and TRI-reagent isolation method, accordingly to the manufacturer's protocol, respectively. For quantitative RT-PCR, cDNA was synthesized from 1 μg-GLUT-4—or 3 μg-BRS-3—of total RNA using the High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-kit. Samples from skeletal muscle pieces and myocytes were subjected to quantitative amplification using the primer sets for human GLUT-4 and BRS-3. The conditions of amplification and detection were optimized and gene expression was normalized with that of the housekeeping 18S gene.

2.5. Immunoblotting

Tissue samples (120 mg) and primary cultured myocytes (2×10^5 cells) were homogenized at 4°C , as previously described (Acitores et al., 2004; Gonzalez et al., 2005a) for BRS-3 protein assays. For the measurement of GLUT-4 and BRS-3 protein, cells were first pre-incubated (37°C) in 1 ml of DMEM-M199 for 30-min, followed by a 60-min incubation in the absence or additional presence of BRS-3-AP or insulin, treated with trypsin-EDTA and finally centrifuged at 500 g for 5-min. The separation and preparation of cytoplasmic and membrane extracts from myocytes were carried out using the Subcellular-Protein-Fractionation-kit, following manufacturer instructions, and kept at -80°C until assay. Immunoblotting was performed as previously described (Villanueva-Peñacarrillo et al., 2011), using α-tubulin as internal loading control.

Table 1
Metabolic characteristics of normal, obese and diabetic patients involved in the study.

	Gender (F/M)	Age (Year)	Glucose (mg/dl)	Ch (mg/dl)	TG (mg/dl)	BMI (kg/m ²)	HbA _{1c} (%)
N	(27/14)	48 ± 2	94 ± 2	184 ± 6	91 ± 7	26 ± 1	<4.5
OB	(6/14)	44 ± 2	130 ± 14*	183 ± 13	167 ± 18	48 ± 1*	7–8
T2D	(8/12)	66 ± 3**†	193 ± 17**†	166 ± 11	146 ± 10	29 ± 7†	12–15

Values (mean ± S.E.M.). N = 41, OB = 20 and T2D = 20 subjects.

* $P < 0.001$ vs N.

† $P < 0.01$ T2D vs OB.

Please cite this article in press as: Ramos-Álvarez, I., et al. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>

2.6. Glucose transport

Cells were treated as previously described (Gonzalez et al., 2005a). Briefly, cells were pre-incubated for 30-min at 37 °C without (control) or with the human GRP receptor specific inhibitor ME (10^{-6} M), BRS-3-AP (10^{-12} – 10^{-7} M), insulin (10^{-8} M), and/or 10^{-6} M wortmannin, 2.5×10^{-5} M PD98059, 10^{-7} M rapamycin—respective inhibitors of PI3K, MAPKs and p70s6 k—that was followed by a further 5-min incubation at 37 °C in the additional presence of 0.2 μ Ci (6.5 pmol) 2-deoxy-D-[1,2- 3 H(N)]glucose. Myocytes, after being washed for removal of the radioactivity non-incorporated to the cells, were scraped, dissolved in 1 ml 1 N NaOH, and then added to 3 ml scintillation liquid for β -counting. The total glucose content was corrected by the unspecific glucose uptake value, obtained in some of the cell samples from each experiment treated in parallel with 0.1 mM cytochalasin B.

2.7. Statistical study

Results are expressed as mean \pm S.E.M., together with the number of observations (n). The statistical significance ($P < 0.05$) of the increments was assessed by one-way analysis of variance, followed by the Least Significant Differences (LSDs) test for post hoc multiple comparisons, using the Statistical Package for the Social Science (SPSS).

3. Results

3.1. BRS-3 expression

We evaluated the BRS-3 gene/protein expression in pieces from skeletal muscle and primary cultured myocytes from normal subjects, OB or T2D patients.

Not only in OB, but also in T2D skeletal muscle pieces, BRS-3 mRNA level was significantly lower (Fig. 1A) than in normal subjects ($n = 18$). Specifically, OB group showed a significantly reduction in the BRS-3 gene expression value, which was similar in magnitude to that measured in T2D patients. These results are parallel with the decrease observed in the BRS-3 protein expression (Fig. 1B) in OB and T2D patients (OB = 9166 ± 502 AU optical density, $n = 5$ and T2D = 6275 ± 753 AU optical density, $n = 5$) compared to normal ($12,556 \pm 1256$ AU optical density, $n = 4$), being the receptor expression in T2D even lower than in the OB group (Fig. 1B).

When human myocytes (Fig. 2A) were incubated for 1-h in the absence and presence of insulin or BRS-3-AP; detectable changes in the BRS-3 gene expression from normal cells, were observed at all ligand concentrations tested, with the magnitude of the effect with the highest concentrations similar to the one induced by insulin (Fig. 2A); however, when obese myocytes were exposed either to BRS-3-AP or insulin (Fig. 2A), mRNA BRS-3 level showed modifications only at 10^{-9} M. The study using T2D myocytes also revealed a maximal increment induced by 10^{-9} M BRS-3-AP in BRS-3 mRNA levels (Fig. 2A).

In membrane of myocytes from three normal subjects (Fig. 2B, Table 2), BRS-3-AP produced a significant increment at 10^{-9} and 10^{-8} M in BRS-3 protein expression. In myocytes from OB, the analogue induced an increase at 10^{-10} M, which did not achieve significance in receptor expression, although it was significant and maximal at 10^{-9} M and maintained at 10^{-8} M (Fig. 2B, Table 2). However, the presence of 10^{-10} M BRS-3-AP in T2D cells (Fig. 2B, Table 2), already stimulated BRS-3 protein expression, being maximal and significantly higher compared to normal. In all study groups, insulin showed a clear trend to stimulate BRS-3 expression (Fig. 2B, Table 2).

Basal level expression of BRS-3 mRNA in myocytes from normal, obese and T2D patients, was lower in OB (1.36 ± 0.038 times down-regulated normal, $n = 3$, $p < 0.01$) and T2D cells (1.93 ± 0.049 times down-regulated normal, $n = 3$, $p < 0.001$). These data reflected the BRS-3 membrane protein expression from obese and diabetic cells (OB = $15,376 \pm 1455$ AU optical density, $n = 4$ and T2D = $13,922 \pm 623$ AU optical density, $n = 4$), which were reduced compared to normal ($20,778 \pm 2078$ AU optical density, $n = 3$) (Fig. 2B, Table 2).

3.2. GLUT-4 expression

BRS-3-AP activates BRS-3, but also GRPR and NMBR (Mantey et al., 2001). Genecardss database described that in human skeletal muscle, BRS-3, GRPR and NMBR are expressed. When myocytes were incubated with BRS-3-AP, significant up-regulation in GLUT-4 expression and glucose transport increment were observed. These effects were not different to those measured when cells were incubated simultaneously with BRS-3-AP and [D-Phe⁶]-Bn-(6-13)methylester, which is a potent human GRPR inhibitor with low affinity for BRS-3 (Ryan et al., 1998); vg: BRS-3-AP 10^{-8} M: $78 \pm 19\%$ Δ of glucose transport control; BRS-3-AP 10^{-8} M + ME 10^{-6} M: $70 \pm 21\%$ Δ of glucose transport control. Also, to clarify these BRS-3-mediated effects induced by BRS-3-AP, we have performed gene silencing analysis of BRS-3, in myocytes from

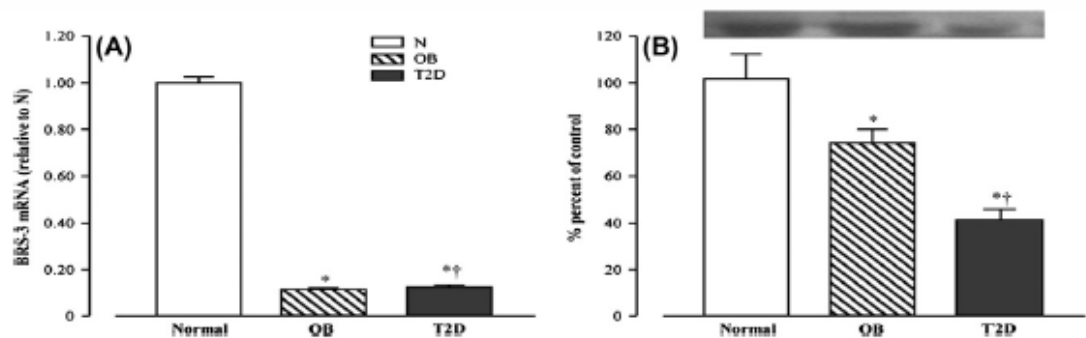


Fig. 1. BRS-3 gene expression and protein levels in muscle pieces from normal, obese or diabetic patients. (A) BRS-3 gene expression level in skeletal muscle pieces. Values (mean \pm S.E.M.), are expressed as copy of numbers by using Ct value relative to control obtained in cells incubated in the absence of peptide, after normalization against 18S rRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) corresponding to N = 18, OB = 10 and T2D = 9 patients. * $P < 0.001$ OB or T2D vs N; † $P < 0.02$ T2D vs OB. (B) BRS-3 protein expression level in skeletal muscle pieces. Values (mean \pm S.E.M.), corresponding to total protein extracted, expressing as a percentage of measurements relative to normal subjects. N = 4, OB = 5 and T2D = 5 patients. Upper panel, immunoblotting analysis. Lower panel quantitative analysis of BRS-3 protein level. † $P < 0.02$ OB or T2D vs N; ‡ $P < 0.02$ T2D vs OB.

Please cite this article in press as: Ramos-Álvarez, I., et al. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes. Molecular and Cellular Endocrinology (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>

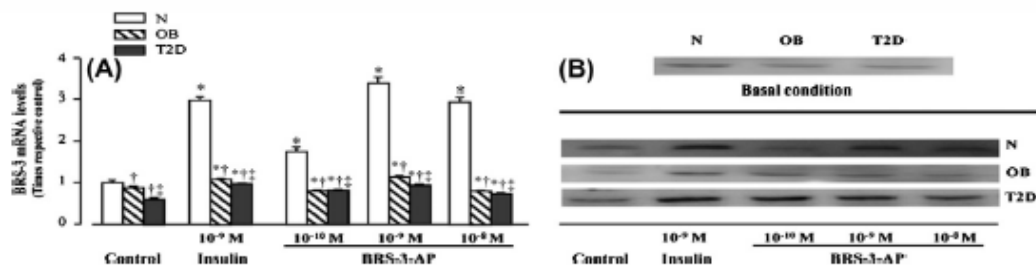


Fig. 2. The effect of BRS-3-AP and insulin on BRS-3 gene expression and protein levels in myocytes from normal, obese or diabetic patients. (A) The effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-9} M insulin, on BRS-3 gene expression in primary culture myocytes. Values (mean \pm S.E.M.) are expressed as copy of numbers by using Ct value relative to control obtained in cells incubated in the absence of peptide, after normalization against 18S rRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) corresponding to N = 3, OB = 3 and T2D = 4 patients. * $P < 0.01$ vs control; $^{\dagger}P < 0.01$ OB or T2D vs N; $^{\ddagger}P < 0.02$ T2D vs OB. (B) Basal condition and effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-9} M insulin, in BRS-3 protein expression level in primary culture myocytes. Upper panel, immunoblotting analysis; basal condition in N = 3, OB = 3 and T2D = 4 patients. Lower panel, immunoblotting analysis BRS-3-AP and insulin effect in N = 3, OB = 3 and T2D = 5 patients.

Table 2

Basal condition and effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-9} M insulin, in BRS-3 protein expression level in primary culture myocytes.

	Control-N (%)		Control (%)	Insulin 10^{-9} M (%)	10^{-10} M	BRS-3-AP 10^{-8} M (%)	10^{-8} M
N	100 \pm 10	N	100 \pm 10	133 \pm 2 [*]	106 \pm 4	171 \pm 17 [*]	153 \pm 9 [*]
OB	74 \pm 7 [†]	OB	100 \pm 10	140 \pm 8 [*]	120 \pm 8	132 \pm 5 [*]	131 \pm 6 [*]
T2D	67 \pm 3 [†]	T2D	100 \pm 10	133 \pm 5 [*]	142 \pm 9 ^{††}	132 \pm 8 [*]	119 \pm 14

Values (mean \pm S.E.M.) corresponding to BRS-3 membrane protein extracted, expressing as a percentage of control. N = 3, OB = 3 and T2D = 5 subjects.

^{*} $P < 0.05$ vs control.

[†] $P < 0.05$ T2D vs N.

normal subjects. A pool of three ON-TARGET siRNA duplexes produced 82% knock-down of BRS-3 mRNA. The increment induced by 10^{-8} M BRS-3-AP on glucose transport (80 ± 15 % of control) detected in no-silenced cells, was significantly reduced to basal level, in BRS-3 knock-down myocytes (2 ± 2 % of control). However, in knock-down-BRS-3 cells no modification of insulin effect on glucose transport was observed. These precautions were taken to be certain that glucose-related effects are induced by BRS-3-AP and exclusively mediated through BRS-3 receptor.

In myocytes, from normal subjects ($n = 7$), OB and T2D patients ($n = 5$ and 6, respectively) incubated in the absence of peptide, no differences were observed in GLUT-4 mRNA level from OB and T2D compared to normal (Fig. 3A). However, when normal myocytes were incubated 1-h in the presence of BRS-3 ligand, tested at 10^{-10} – 10^{-8} M (Fig. 3A), significantly higher gene glucotransporter expressions were detected, as previously observed with insulin, and achieving maximal increase at 10^{-8} M (Fig. 3A). The obese state showed that both, the BRS-3 agonist analogue (10^{-10} – 10^{-8} M) and insulin (10^{-9} M) produced significant increments in GLUT-4 gene expression (Fig. 3A). The same pattern (Fig. 3A) was observed in the analysis of glucotransporter gene expression in six T2D patients. The efficacy for increasing GLUT-4 expression of BRS-3-AP at 10^{-8} M in altered metabolic states was lower compared to normal (Fig. 3A).

Because GLUT-4 protein represents a relevant role in the insulin-induced glucose transport, we investigated its expression level and intracellular distribution in myocytes from normal, OB and T2D states. In the cytoplasmic fraction, no differences in the expression level of GLUT-4 protein were found among myocytes from normal subjects ($n = 3$), OB ($n = 4$) and T2D patients ($n = 6$). When the cells of each group, were exposed to BRS-3-AP (10^{-10} – 10^{-8} M) during 60-min, the levels of protein were unchanged compared with those in the control (data not shown).

In the plasma membrane fraction of normal subjects, the presence of GLUT-4 protein was higher compared to OB and T2D

patients (Fig. 3B, Table 3). Therefore, the effect of insulin increased the translocation of glucotransporter to the fraction of the plasma membrane, in all studied groups with respect to the control value, obtained in myocytes incubated in the absence of hormone (Fig. 3B, Table 3). BRS-3-AP clearly increased GLUT-4 presence in plasma membrane from normal subjects as well as in obese cells (Fig. 3B). The presence of ligand, not only stimulated GLUT-4 translocation in myocytes from T2D patients at 10^{-9} M but also at 10^{-10} M, which was significantly higher than the effect observed in plasma membrane from normal and obese patients at the same concentration (Fig. 3B, Table 3).

3.3. Glucose transport

In primary cultured human myocytes from normal subjects, BRS-3-AP (Fig. 4) caused a concentration-related stimulation of glucose transport—with respect to the value obtained in cells incubated in the absence of peptide (23.0 ± 7.0 fmol/ 2×10^4 cells, $n = 9$)—which was almost significant at 10^{-10} M of the peptide (40 ± 10 % of normal-control), maximal at 10^{-9} M (76 ± 11 % Δ , $p < 0.05$) and maintained thereafter up to 10^{-7} M (BRS-3-AP 10^{-8} M: 80 ± 12 % Δ , $p < 0.05$; 10^{-7} M: 96 ± 32 % Δ of normal-control, $p < 0.05$), effect similar to that induced by insulin (10^{-8} M: 80 ± 14 % Δ , $p < 0.05$) (Fig. 4).

In eight OB patients, the glucose uptake control value (9.8 ± 1.7 fmol/ 2×10^4 cells), obtained in cells incubated in the absence of peptide was much lower than that found in normal subjects. As shown in Fig. 4, cells from the obese patients still retained the response capability to BRS-3-AP, reaching a value by the peptide at 10^{-9} M (22.2 ± 1.4 fmol/ 2×10^4 cells) similar to that previously found in control cells from normal subjects. Myocytes from T2D patients (Fig. 4), as described above in OB cells, showed a net uptake of tritiated 2-deoxy-D-glucose control value (8.3 ± 0.8 fmol/ 2×10^4 cells, $n = 6$) dramatically lower than in normal subjects. Although, the presence of BRS-3-AP at 10^{-9} M

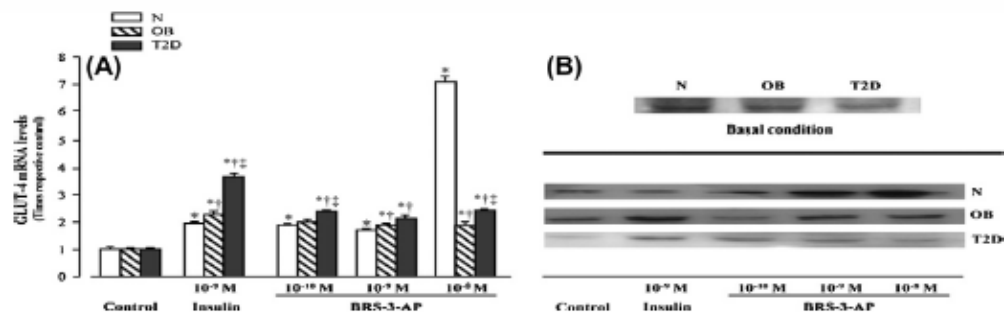


Fig. 3. The effect of BRS-3-AP and insulin on GLUT-4 gene expression and protein levels in myocytes from normal, obese or diabetic patients. (A) The effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-8} M insulin, in GLUT-4 gene expression in primary culture myocytes. Values, are expressed as copy of numbers by using Ct value relative to control obtained in cells incubated in the absence of peptide, after normalization against 18S rRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) corresponding to N = 7, OB = 5 and T2D = 6 patients. * $P < 0.001$ vs control; † $P < 0.05$ OB or T2D vs N; ‡ $P < 0.001$ T2D vs OB. (B) Basal condition and effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-8} M insulin, in GLUT-4 membrane protein expression level in primary culture myocytes. Upper panel, immunoblotting analysis: basal condition in N = 3, OB = 3 and T2D = 4 patients. Lower panel, immunoblotting analysis BRS-3-AP and insulin effect in N = 4, OB = 3 and T2D = 6 patients.

Table 3

Basal condition and effect of 10^{-10} up to 10^{-8} M BRS-3-AP and 10^{-8} M insulin, in GLUT-4 translocation in primary myocytes.

	Control-N (%)	N	Control (%)	Insulin 10^{-8} M (%)	10^{-10} M	BRS-3-AP 10^{-8} M (%)	10^{-8} M
N	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10	137 ± 5*	113 ± 2	197 ± 5*	185 ± 9*
OB	83 ± 4†	100 ± 10	100 ± 10	145 ± 6*	123 ± 9	182 ± 9*	173 ± 10*
T2D	70 ± 5†	100 ± 10	100 ± 10	150 ± 7*	136 ± 6††	143 ± 7†,‡	124 ± 5†,‡

Values (mean ± S.E.M.) corresponding to GLUT-4 membrane protein extracted, expressing as a percentage of control. N = 4, OB = 3 and T2D = 6 patients.

* $P < 0.02$ vs control.

† $P < 0.05$ OB or T2D vs N.

‡ $P < 0.02$ T2D vs OB.

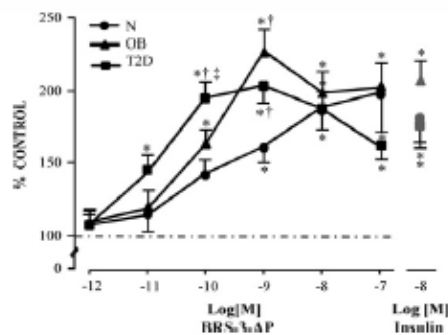


Fig. 4. The effect of BRS-3-AP and insulin on glucose transport in myocytes from normal, obese or diabetic patients. The effect of 10^{-12} up to 10^{-7} M BRS-3-AP and insulin (10^{-8} M), on glucose transport, in primary culture myocytes. Values (mean ± S.E.M.) are relative to the respective paired control obtained in cells incubated in the absence of peptide. N = 12, OB = 8 and T2D = 6 patients. * $P < 0.05$ vs control; † $P < 0.01$ OB or T2D vs N; ‡ $P < 0.05$ T2D vs OB.

stimulated glucose transport (16.9 ± 1.0 fmol/ 2×10^4 cells, $p < 0.001$ vs T2D-control, $n = 6$), the level achieved was reduced compared to that measured in OB cells. Relative to its own control cells, the respective increases produced by 10^{-8} M insulin (Fig. 4), in both, OB and T2D cells were not different from that recorded in the normal group; however, in OB patients the increment exerted by BRS-3 at 10^{-9} M was much higher than in normal cells. In myocytes from T2D group, the maximal hexose transport was achieved at 10^{-10} M BRS-3-AP; nevertheless, in OB and normal cells, the equimolar amount of peptide induced lower increments on the glucose uptake (Fig. 4).

In muscle cells from 12 normal subjects, the important signaling cascades in mediating BRS-3-AP stimulated glucose transport were explored, by using various kinase inhibitors. When 10^{-6} M wortmannin—a PI3K inhibitor—was present (Fig. 5), a clear abolishment of 10^{-8} M BRS-3-AP induced increase of glucose transport (40.5 ± 0.6 fmol/ 2×10^4 cells) was detected (24.8 ± 0.8 fmol/ 2×10^4 cells) as well as, when p44/p42MAPKs activity was inhibited by PD98059 (Fig. 5), the stimulated 2-deoxy-D-glucose incorporation by 10^{-8} M BRS-3-AP was prevented (23.3 ± 1.2 fmol). However, when cells were treated with 10^{-7} M rapamycin—considered a p70s6k inhibitor—no modification of the increment exerted by 10^{-8} M BRS-AP (37.0 ± 1.6 fmol/ 2×10^4 cells) was observed (Fig. 5).

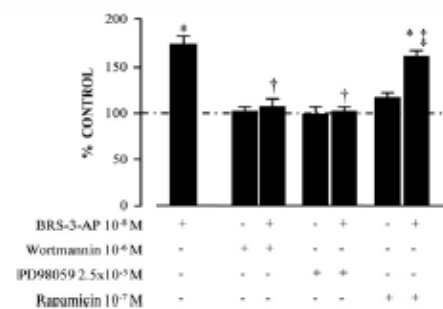


Fig. 5. The effect of 10^{-6} M wortmannin, 10^{-7} M rapamycin or 2.5×10^{-5} M PD98059 on the 10^{-8} M BRS-3-AP induced stimulation of glucose transport, in primary culture myocytes from normal subjects. Values (mean ± S.E.M.) are expressed relative to the paired control values obtained in cells incubated in the absence of both peptide and inhibitor. N = 12, subjects. * $P < 0.05$ peptide vs control; † $P < 0.01$ peptide + inhibitor vs peptide; ‡ $P < 0.001$ peptide + rapamycin vs peptide.

Please cite this article in press as: Ramos-Álvarez, I., et al. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes. Molecular and Cellular Endocrinology (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>

4. Discussion

The few studies which suggest an association between obesity and the BRS-3 receptor, are primarily focused on the analysis of metabolic parameters and were based on adipose tissue and animal models (Guan et al., 2010; Matsumoto et al., 2003; Nakamichi et al., 2004; Ohki-Hamazaki et al., 1997). The present results are novel because the study has been performed entirely in human, utilizing the skeletal muscle tissue, closely related to glucose uptake and metabolism (Acitores et al., 2005, 2004; Ames et al., 2008) and second, by the utilization of human primary culture myocytes, to recreate *in vitro*, normal and altered metabolic human conditions (Gonzalez et al., 2005a,b; Villanueva-Peñacarrillo et al., 2011).

In this study, we demonstrated not only that skeletal muscle expresses functional BRS-3 as previously described in human gene databases, but also, that lower than normal levels of BRS-3 mRNA/protein were detected in obese and T2D patients. This fact raises the possibility of glucose contributing to changes in BRS-3 expression; however, pointed out that the daily insulin-treatment in T2D patients did not seem to induce positive improvements in gene/protein value expression.

Our results were in consonance with the wide range of metabolic disorders associated with the mild obesity observed in mice lacking BRS-3 receptor (Ohki-Hamazaki et al., 1997), and in addition, represent a possible linkage between human BRS-3 receptor and diabetes.

Further assays, were performed in myocytes from normal, OB and T2D patients. In normal cells, the presence of insulin produced a significant increment of BRS-3 gene expression. These data demonstrated insulin can function as a potential mediator in the regulation of BRS-3 gene, as it has been previously shown in cells expressing high levels of insulin receptor, where several other regulation processes could be induced by the hormone (Burgering et al., 1991; Pandini et al., 2003). BRS-3-AP, at low concentrations, increased BRS-3 gene expression, and also acting as a possible regulator of BRS-3 receptor in normal cells. Although the ligand effect, was not so robust for BRS-3 gene expression in altered state myocytes, BRS-3 protein analysis reflected, in all groups, a significant increment of BRS-3 membrane protein, specifically in cells from patients with metabolic alterations, which were more sensitive to this analogue than myocytes from normal subjects, and T2D cells even more than in obese patients.

Insulin stimulated GLUT-4 translocation in human skeletal muscle (Thorell et al., 1999) and also it has been reported that unbalanced levels of GLUT-4 mRNA/protein were found in insulin-resistant and T2D models (Moreno et al., 2011). In our assays, when myotubes from normal subjects, were incubated in the presence of BRS-3-AP, an important stimulation of GLUT-4 mRNA level was detected in normal cells; and the same effect was induced in OB and T2D patients, although attenuated. Those facts, allow us to affirm that not only BRS-3 is involved in the glucose-related effects but also its synthetic agonist. Moreover, GLUT-4 is the main membrane protein responsible for insulin-induced hexose uptake (Burant et al., 1991); when we examined GLUT-4 cytoplasmic protein in myocytes, the levels measured in normal subjects were unchanged compared with those in obese and T2D groups, as well as previously described in adipocytes from BRS-3 deficient mice respect to wild-type (Nakamichi et al., 2004).

However, when membrane distribution of GLUT-4 protein was analyzed, markedly differences between the normal myocytes and the altered cells were observed. The GLUT-4 protein basal level was lower in OB and T2D cells compared to normal, suggesting an impaired GLUT-4 translocation (Stuart et al., 2001). Both, the presence of BRS-3-AP or insulin, in cells with/without metabolic

alterations, clearly improved GLUT-4 translocation from the cytosol to the membrane. As previously observed, in BRS-3 membrane expression assays, cells from OB and T2D patients showed, related to GLUT-4 translocation, the same pattern of sensitivity to BRS-3-AP; being the response of the altered cells to the ligand, significantly higher compared to normal state, and even higher in T2D myocytes.

In fat cells from BRS-3-deficient mice stimulated with insulin, GLUT-4 protein was not translocated to the membrane; furthermore, it was strongly suggested that this impairment must have caused the lack of insulin-induced glucose uptake (Nakamichi et al., 2004). Because of the relevance of muscle tissue, we explored the glucose transport parameter, finding that basal glucose uptake in obese muscle cells was significantly lower than that in normal subjects, with a mirror image in the case of muscle cells from T2D patients; and yet, the cells clearly responded to insulin as previously recorded (Gonzalez et al., 2005a,b; Villanueva-Peñacarrillo et al., 2011). In myocytes from normal subjects, BRS-3-AP clearly induced increases in the incorporation of 2-deoxy-D-glucose in a dose-response manner, being maximal at 10^{-9} M and maintained thereafter up to 10^{-7} M; showing again the implication of this synthetic compound in glucose-related effects. Likewise, in obese cells the compound stimulated glucose transport with a pattern similar to normal, and they still retained the response capability, not only to insulin, but also to BRS-3-AP, achieving a net value by 10^{-9} M peptide similar to that previously found in control cells from normal subjects, which could be interpreted as a normalizing effect (Gonzalez et al., 2005b; Villanueva-Peñacarrillo et al., 2001). In addition, BRS-3-AP showed in obese cells to be more potent, the increment exerted by BRS-3 at 10^{-9} M was much higher than in normal cells. Unexpectedly, in T2D group, the maximal hexose transport was achieved at 10^{-10} M BRS-3-AP, showing not only to be sensitive to the BRS-3 agonist but also that its response is even higher than in normal and obese patients. The facts related to BRS-3-AP sensitivity in gene/protein expression and glucose transport revealed in this human muscle study, require further experiments to gain insight into the mechanism of the ligand/receptor system in normal and altered metabolic states.

The BRS-3-AP-induced stimulation in glucose transport was completely inhibited by wortmannin, indicating that activation of PI3K is crucial in this effect of the BRS-3-AP, as it seems to be for insulin-induced glucose transport in muscle cells (Gonzalez et al., 2005a,b; Villanueva-Peñacarrillo et al., 2011). Inhibition of p42/44MAPKs by PD98059 completely prevented the stimulatory effect of BRS-3-AP upon hexose transport, indicating a role of these kinases in the effect of the agonist in myocytes. According to that, it has been shown in the lung cancer cellular line NCI-1299, transfected with human BRS-3, the presence of BRS-3-AP resulted in a stimulation of transcription factor Elk-1, in a manner dependent on MEK-1 (Weber et al., 2001). The fact that rapamycin did not block BRS-3-AP effect on glucose transport, has been also described in other cases. GLP-1 induced a significant increase in the phosphorylation level of p70s6K, in adipocytes and hepatocytes isolated from normal rats, and neither glucose transport nor glycogen synthase α activity was abolished by rapamycin. Moreover, in adipocytes from normal rats, exendin-4 stimulated p70s6K phosphorylation, but not inhibition on glucose transport was observed in the presence of rapamycin. However, in primary cultured human myocytes, rapamycin produced a partial inhibition of GLP-1 glucose transport increase, but completely blocked insulin-effect. (Gonzalez et al., 2005a; Redondo et al., 2003; Sancho et al., 2005).

These results confirm that the BRS-3 receptor can have an important effect in glucose homeostasis in human muscle tissue and that there are significant differences between the cellular

effects in normal and obese or diabetic muscle cells. For the first time, we report BRS-3 mRNA levels are reduced in obese and T2D patients, compared to normal subjects, adding support to the idea of using this receptor as a molecular target in both pathologies. Moreover, we showed *in vitro* experiments in human primary culture myocytes, where BRS-3-AP is also implicated in glucose-related effects – exclusively mediated through BRS-3 receptor – and cells from altered metabolic states are more sensitive to this ligand than normal type. These results suggest further studies related to BRS-3 receptor, which could lead to new approaches in the management of obesity and diabetes.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (CP08/00158), (ENDODIAB, CIBERDEM) and Fundación Eugenio Rodríguez Pascual (12224/001), Spain. I.R.A. and Z.M.V. are Research Fellow from the Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz; S.P.N. is recipient of a research contract from RETICEF (RD06/0013/1002). The authors declare that there is not conflict of interest that would prejudice the impartiality of the reported research. We thank Estrella Martín-Crespo (Dpt. of Metabolism, Nutrition and Homones, IIS-Fundación Jiménez Díaz) for excellent technical assistance and Felicidad López (Dpt. of Surgery, Fundación Jiménez Díaz) for outstanding sample-coordination.

References

- Acitores, A., Gonzalez, N., Sancho, V., Valverde, I., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2004. Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 180, 389–398.
- Acitores, A., Gonzalez, N., Sancho, V., Arnes, L., Valverde, I., Malaisse, W.J., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2005. Participation of protein kinases in the stimulant action of GLP-1 on 2-deoxy-D-glucose uptake by normal rat skeletal muscle. *Horm. Metab. Res.* 37, 275–280.
- Arnes, L., Gonzalez, N., Romero-Esteban, P., Sancho, V., Acitores, A., Valverde, I., Delgado, E., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2008. Characteristics of GLP-1 and exendin-4 action upon glucose transport and metabolism in type 2 diabetic rat skeletal muscle. *Int. J. Mol. Med.* 22, 127–132.
- Burant, C.F., Shultz, W.L., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Persin, J.E., Bell, G.I., 1991. Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 47, 349–387, discussion 387–8.
- Burgering, B.M., Medema, R.H., Maassen, J.A., van de Wetering, M.L., van der Eb, A.J., McCormick, F., Bos, J.L., 1991. Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation. *EMBO J.* 10, 1103–1109.
- Fathi, Z., Corjay, M.H., Shapira, H., Wada, E., Benya, R., Jensen, R., Viallet, J., Sausville, E.A., Battey, J.F., 1993. BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 5979–5984.
- Feng, Y., Guan, X.M., Li, J., Metzger, J.M., Zhu, Y., Juhl, K., Zhang, B.B., Thornberry, N.A., Reitman, M.L., Zhou, Y.P., 2011. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets across multiple species. *Endocrinology* 152, 4106–4115.
- Gonzalez, N., Acitores, A., Sancho, V., Valverde, I., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2005a. Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul. Pept.* 126, 203–211.
- Gonzalez, N., Sancho, V., Martín-Duce, A., Romero-Esteban, P., Valverde, I., Malaisse, W.J., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2005b. GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients. *Int. J. Mol. Med.* 16, 747–752.
- Guan, X.M., Chen, H., Dobbelaar, P.H., Dong, Y., Fong, T.M., Gagen, K., Gorski, J., He, S., Howard, A.D., Jian, T., Jiang, M., Kan, Y., Kelly, T.M., Kosinski, J., Lin, L.S., Liu, J., Marsh, D.J., Metzger, J.M., Miller, R., Nargund, R.P., Palyha, O., Shearman, L., Shen, Z., Stearns, R., Strack, A.M., Stribling, S., Tang, Y.S., Wang, S.P., White, A., Yu, H., Reitman, M.L., 2010. Regulation of energy homeostasis by bombesin receptor subtype-3: selective receptor agonists for the treatment of obesity. *Cell Metab.* 11, 101–112.
- Guan, X.M., Metzger, J.M., Yang, L., Raustad, K.A., Wang, S.P., Spann, S.K., Kosinski, J.A., Yu, H., Shearman, L.P., Randle, T.D., Palyha, O., Kan, Y., Kelly, T.M., Sebat, L., Lin, L.S., Dragovic, J., Lyons, K.A., Crow, S., Nargund, R.P., Marsh, D.J., Strack, A.M., Reitman, M.L., 2011. Antiobesity effect of MK-5046, a novel bombesin receptor subtype-3 agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 356–364.
- Hotta, K., Matsukawa, Y., Nishida, M., Kotani, K., Takahashi, M., Kuriyama, H., Nakamura, T., Wada, K., Yamashita, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2000. Mutation in bombesin receptor subtype-3 gene is not a major cause of obesity in the Japanese. *Horm. Metab. Res.* 32, 33–34.
- Jensen, R.T., Battey, J.F., Spindel, E.R., Benya, R.V., 2008. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol. Rev.* 60, 1–42.
- Liu, H.J., Tan, Y.R., Li, M.L., Liu, C., Xiang, Y., Qin, X.Q., 2011. Cloning of a novel protein interacting with BRS-3 and its effects in wound repair of bronchial epithelial cells. *PLoS One* 6, e23072.
- Manthey, S.A., Weber, H.C., Sainz, E., Akesson, M., Ryan, R.R., Pradhan, T.K., Searles, R.P., Spindel, E.R., Battey, J.F., Coy, D.H., Jensen, R.T., 1997. Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors. *J. Biol. Chem.* 272, 26062–26071.
- Manthey, S.A., Coy, D.H., Pradhan, T.K., Igarashi, H., Rizo, J.M., Shen, L., Hou, W., Hocar, S.J., Jensen, R.T., 2001. Rational design of a peptide agonist that interacts selectively with the orphan receptor, bombesin receptor subtype 3. *J. Biol. Chem.* 276, 9219–9229.
- Matsumoto, K., Yamada, K., Wada, E., Hasegawa, T., Usui, Y., Wada, K., 2003. Bombesin receptor subtype-3 modulates plasma insulin concentration. *Peptides* 24, 83–90.
- Moreno, P., Nuche-Berenguer, B., Gutierrez-Rojas, I., Acitores, A., Sancho, V., Valverde, I., Gonzalez, N., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2011. Normalizing action of exendin-4 and GLP-1 in the glucose metabolism of extrapancreatic tissues in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *J. Mol. Endocrinol.* 48, 37–47.
- Nakamichi, Y., Wada, E., Aoki, K., Ohara-Imaizumi, M., Kikuta, T., Nishiwaki, C., Matsushima, S., Watanabe, T., Wada, K., Nagamatsu, S., 2004. Functions of pancreatic beta cells and adipocytes in bombesin receptor subtype-3-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 698–703.
- Ohki-Hamazaki, H., Watake, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, J., Kikuyama, S., Wada, E., Wada, K., 1997. Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* 390, 165–169.
- Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R., Belfiore, A., 2003. Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. *J. Biol. Chem.* 278, 42178–42189.
- Pradhan, T.K., Katsuno, T., Taylor, J.F., Kim, S.H., Ryan, R.R., Manthey, S.A., Donohue, P.J., Weber, H.C., Sainz, E., Battey, J.F., Coy, D.H., Jensen, R.T., 1998. Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 275–287.
- Redondo, A., Trigo, M.V., Acitores, A., Valverde, I., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2003. Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204, 43–50.
- Reitman, M.L., Dishy, V., Moreau, A., Denney, W.S., Liu, C., Kraft, W.K., Mejia, A.V., Matson, M.A., Stoch, S.A., Wagner, J.A., Lai, E., 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-5046, a bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonist, in healthy patients. *J. Clin. Pharmacol.* 52, 1306–1316.
- Reubi, J.C., Wenger, S., Schumacher, M., Schaefer, J.C., Guger, M., 2002. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand [¹²⁵I]-[D-TYR(6)] beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6–14). *Clin. Cancer Res.* 8, 1139–1146.
- Ryan, R.R., Weber, H.C., Hou, W., Sainz, E., Manthey, S.A., Battey, J.F., Coy, D.H., Jensen, R.T., 1998. Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3. *J. Biol. Chem.* 273, 13613–13624.
- Sancho, V., Trigo, M.V., Gonzalez, N., Valverde, I., Malaisse, W.J., Villanueva-Penacarrillo, M.L., 2005. Effects of glucagon-like peptide-1 and exendin-4 on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 27–38.
- Stuart, C.A., Wen, G., Williamson, M.E., Jiang, J., Gilkison, C.R., Blackwell, S.J., Nagamati, M., Ferrando, A.A., 2001. Altered GLUT1 and GLUT3 gene expression and subcellular redistribution of GLUT4: protein in muscle from patients with acanthosis nigricans and severe insulin resistance. *Metabolism* 50, 771–777.
- Thorell, A., Hirshman, M.F., Nygren, J., Jorfeldt, L., Wojtaszewski, J.F., Dufresne, S.D., Horton, E.S., Ljungqvist, O., Goodyear, L.J., 1999. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277, E733–E741.
- Villanueva-Penacarrillo, M.L., Puente, J., Redondo, A., Clemente, F., Valverde, I., 2001. Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 15, 241–248.
- Villanueva-Penacarrillo, M.L., Martín-Duce, A., Ramos-Álvarez, I., Gutierrez-Rojas, I., Moreno, P., Nuche-Berenguer, B., Acitores, A., Sancho, V., Valverde, I., Gonzalez, N., 2011. Characteristic of GLP-1 effects on glucose metabolism in human skeletal muscle from obese patients. *Regul. Peptides* 168, 39–44.
- Weber, H.C., Walters, J., Leyton, J., Gasbang, M., Purdom, S., Jensen, R.T., Coy, D.H., Ellis, C., Clark, G., Moody, T.W., 2001. A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 412, 13–20.

Please cite this article in press as: Ramos-Álvarez, I., et al. Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.025>